

Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/EP05/000695

International filing date: 21 January 2005 (21.01.2005)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: ES

Number: P200400120

Filing date: 21 January 2004 (21.01.2004)

Date of receipt at the International Bureau: 24 March 2005 (24.03.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse



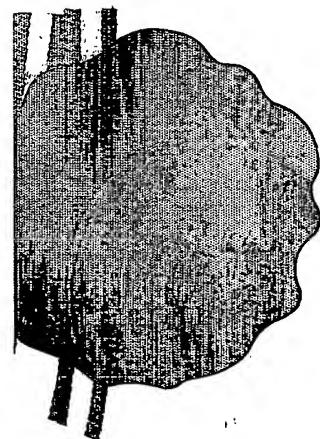
MINISTERIO
DE INDUSTRIA, TURISMO
Y COMERCIO



Oficina Española
de Patentes y Marcas

CERTIFICADO OFICIAL

Por la presente certifico que los documentos adjuntos son copia exacta de
la solicitud de PATENTE DE INVENCIÓN número 200400120, que tiene
fecha de presentación en este Organismo el 21 de Enero de 2004.



Madrid, 10 de Febrero de 2005

El Director del Departamento de Patentes
e Información Tecnológica

P.D.

ANA M^a REDONDO MÍNGUEZ



(1) MODALIDAD: <input checked="" type="checkbox"/> PATENTE DE INVENCION <input type="checkbox"/> MODELO DE UTILIDAD		4 ENE 21 11:25						
(2) TIPO DE SOLICITUD: <input type="checkbox"/> ADICIÓN A LA PATENTE <input type="checkbox"/> SOLICITUD DIVISIONAL <input type="checkbox"/> CAMBIO DE MODALIDAD <input type="checkbox"/> TRANSFORMACIÓN SOLICITUD PATENTE EUROPEA <input type="checkbox"/> PCT: ENTRADA FASE NACIONAL		(3) EXP. PRINCIPAL O DE ORIGEN: MODALIDAD Nº SOLICITUD FECHA SOLICITUD						
		FECHA Y HORA DE PRESENTACIÓN EN LA O.E.P.M.						
		FECHA Y HORA PRESENTACIÓN EN LUGAR DISTINTO O.E.P.M.						
		(4) LUGAR DE PRESENTACIÓN: CÓDIGO MADRID 28						
(5) SOLICITANTE (S): APELLIDOS O DENOMINACIÓN SOCIAL CONSEJO SUP. INVESTIG. CIENTÍFICAS BIONOSTRA, S.L.		NOMBRE		NACIONALIDAD ESPAÑOLA ESPAÑOLA	CÓDIGO PAÍS ES ES	DNI/CIF Q2818002D	CNAE	PYME
(6) DATOS DEL PRIMER SOLICITANTE: DOMICILIO SERRANO, 117 LOCALIDAD MADRID PROVINCIA MADRID PAÍS RESIDENCIA ESPAÑA NACIONALIDAD ESPAÑOLA		TELÉFONO 91 5855000 FAX 91 5855287 CORREO ELECTRÓNICO ott@csic.es CÓDIGO POSTAL 28006 CÓDIGO PAÍS ES CÓDIGO PAÍS ES						
(7) INVENTOR (ES): RODRÍGUEZ AGUIRRE RUIZ CASTÓN GONZÁLEZ DE LLANO		APELUDOS JOSE FCO JOSÉ Mª DOLORES		NACIONALIDAD ESPAÑOLA ESPAÑOLA ESPAÑOLA	CÓDIGO PAÍS ES ES ES			
(8) <input type="checkbox"/> EL SOLICITANTE ES EL INVENTOR <input checked="" type="checkbox"/> EL SOLICITANTE NO ES EL INVENTOR O ÚNICO INVENTOR		(9) MODO DE OBTENCIÓN DEL DERECHO: <input checked="" type="checkbox"/> INVENC. LABORAL <input type="checkbox"/> CONTRATO <input type="checkbox"/> SUCESIÓN						
(10) TÍTULO DE LA INVENCION: CÁPSIDAS VACÍAS QUÍMERICAS DEL VIRUS CAUSANTE DE LA ENFERMEDAD DE LA BURSITIS INFECCIOSA (IBDV), SU PROCEDIMIENTO DE OBTENCIÓN Y APLICACIONES								
(11) EFECTUADO DEPÓSITO DE MATERIA BIOLÓGICA: <input type="checkbox"/> SI <input checked="" type="checkbox"/> NO								
(12) EXPOSICIONES OFICIALES: LUGAR								
(13) DECLARACIONES DE PRIORIDAD: PAÍS DE ORIGEN								
(14) EL SOLICITANTE SE ACOGE AL APLAZAMIENTO DE PAGO DE TASAS PREVISTO EN EL ART. 162. LEY 11/86 DE PATENTES <input type="checkbox"/>								
(15) AGENTE /REPRESENTANTE: NOMBRE Y DIRECCIÓN POSTAL COMPLETA. (SI AGENTE P.I., NOMBRE Y CÓDIGO) (RELLÉNENSE, ÚNICAMENTE POR PROFESIONALES)								
(16) RELACIÓN DE DOCUMENTOS QUE SE ACOMPAÑAN: <input checked="" type="checkbox"/> DESCRIPCIÓN Nº DE PÁGINAS: <input checked="" type="checkbox"/> Nº DE REVINDICACIONES: <input checked="" type="checkbox"/> DIBUJOS. Nº DE PÁGINAS: <input checked="" type="checkbox"/> LISTA DE SECUENCIAS Nº DE PÁGINAS: <input checked="" type="checkbox"/> RESUMEN <input type="checkbox"/> DOCUMENTO DE PRIORIDAD <input type="checkbox"/> TRADUCCIÓN DEL DOCUMENTO DE PRIORIDAD							FIRMA DEL SOLICITANTE O REPRESENTANTE (VER COMUNICACIÓN)	
							FIRMA DEL FUNCIONARIO	
NOTIFICACIÓN SOBRE LA TASA DE CONCESIÓN: Se le notifica que esta solicitud se considerará retirada si no procede al pago de la tasa de concesión; para el pago de esta tasa dispone de tres meses a contar desde la publicación del anuncio de la concesión en el BOPI, más los diez días que establece el art. 81 del R.D. 2245/1986.								

P200400120

FECHA DE PRESENTACIÓN

RESUMEN Y GRÁFICO

RESUMEN (Máx. 150 palabras)

CÁPSIDAS VACÍAS QUÍMERICAS DEL VIRUS CAUSANTE DE LA ENFERMEDAD DE LA BURSITIS INFECCIOSA (IBDV), SU PROCEDIMIENTO DE OBTENCIÓN Y APLICACIONES

Las cápsidas vacías químéricas del virus causante de la enfermedad de la bursitis infecciosa (IBDV) están constituidas por ensamblaje de (i) proteínas pVP2 de IBDV y (ii) proteínas de fusión que comprenden una región A constituida por la proteína VP3 de IBDV unida a una región B constituida por un polipéptido heterólogo que comprende un polipéptido de interés, tal como un polipéptido útil en vacunación, terapia o diagnóstico.

GRÁFICO



MINISTERIO
DE CIENCIA
Y TECNOLOGÍA



Oficina Española
de Patentes y Marcas

NÚMERO DE SOLICITUD

P200400120

FECHA DE PRESENTACIÓN

PATENTE DE INVENCIÓN

MODELO DE UTILIDAD

(5) SOLICITANTES:	APELLIDOS O DENOMINACIÓN SOCIAL	NOMBRE	NACIONALIDAD	CÓDIGO PAÍS	DNI/CIF	CNAE	PYME

(7) INVENTORES:	APELLIDOS	NOMBRE	NACIONALIDAD
RODRÍGUEZ AGUIRRE		M ^a DOLORES	ESPAÑOLA
BLANCO CHAPINAL		SOLEDAD	ESPAÑOLA
ÖÑA BLANCO		ANA M ^a	ESPAÑOLA
SAUGAR GÓMEZ		IRENE	ESPAÑOLA
ABAITU ELUSTONDO		FERNANDO	ESPAÑOLA
LUQUE BUZO		DANIEL	ESPAÑOLA
RODRÍGUEZ FERNÁNDEZ-ALBA		JUAN RAMÓN	ESPAÑOLA

(12) EXPOSICIONES OFICIALES:	LUGAR	FECHA

(13) DECLARACIONES DE PRIORIDAD:	CÓDIGO PAÍS	NÚMERO	FECHA
PAÍS DE ORIGEN			



(12)

SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCIÓN

(21) NÚMERO DE SOLICITUD
P200400120

(31) NÚMERO	DATOS DE PRIORIDAD (32) FECHA	(33) PAÍS	(22) FECHA DE PRESENTACIÓN
(71) SOLICITANTE (S) CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS Y BIONOSTRA, S.L. DOMICILIO SERRANO, 117 - 28006 MADRID			(62) PATENTE DE LA QUE ES DIVISORIA
(72) INVENTOR (ES) José Francisco Rodríguez Aguirre, José Ruiz Castón, M ^a Dolores González de Liano, M ^a Dolores Rodríguez Aguirre, Soledad Blanco Chapinal, Ana M ^a Oña Blanco, Irene Saugar Gómez, Fernando Abaitua Elustondo, Daniel Luque Buzo y Juan Ramón Rodríguez Fernández-Alba			NACIONALIDAD ESPAÑOLA
(51) Int. Cl.	GRÁFICO (SÓLO PARA INTERPRETAR RESUMEN)		
(54) TÍTULO DE LA INVENCIÓN CÁPSIDAS VACÍAS QUÍMÉRICAS DEL VIRUS CAUSANTE DE LA ENFERMEDAD DE LA BURSITIS INFECCIOSA (IBDV), SU PROCEDIMIENTO DE OBTENCIÓN Y APLICACIONES			

(57) RESUMEN

CÁPSIDAS VACÍAS QUÍMÉRICAS DEL VIRUS CAUSANTE DE LA ENFERMEDAD DE LA BURSITIS INFECCIOSA (IBDV). SU PROCEDIMIENTO DE OBTENCIÓN Y APLICACIONES

Las cápsidas vacías químéricas del virus causante de la enfermedad de la bursitis infecciosa (IBDV) están constituidas por ensamblaje de (i) proteínas pVP2 de IBDV y (ii) proteínas de fusión que comprenden una región A constituida por la proteína VP3 de IBDV unida a una región B constituida por un polipéptido heterólogo que comprende un polipéptido de interés, tal como un polipéptido útil en vacunación, terapia o diagnóstico.

CÁPSIDAS VACÍAS QUÍMERICAS DEL VIRUS CAUSANTE DE LA ENFERMEDAD DE LA BURSITIS INFECCIOSA (IBDV), SU PROCEDIMIENTO DE OBTENCIÓN Y APLICACIONES

5. CAMPO DE LA INVENCIÓN

La invención se relaciona con la producción de partículas vacías químéricas del virus causante de la enfermedad de la bursitis infecciosa (IBDV) y sus aplicaciones.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

10 Las partículas virales son estructuras especializadas en el empaquetamiento y la vehiculización de ácidos nucleicos y proteínas. Una característica general de las partículas virales es su excelente capacidad para la estimulación de la respuesta inmune del hospedador. Estas propiedades convierten a las partículas virales en agentes de extraordinario interés para el desarrollo tanto de sistemas de transporte intracelular 15 (delivery systems) como para la generación de vacunas particuladas. La utilización de diferentes sistemas de expresión genética ha facilitado la producción de pseudopartículas virales o cápsidas virales vacías (VLPs) de diferentes tipos de virus (Patente US 6,458,362 Casal, et al. 2002. Recombinant VP2 parvoviral pseudo-particles encoding CTL or T- helper cell epitopes; US 5,932,426 Baralle, et al. 1999. Molecular presenting system; US 20 6,602,705 Barnett, et al. 2003 Expression of HIV polypeptides and production of virus- like particles). La manipulación genética de estos sistemas de expresión permite, a su vez, la producción de VLPs que contienen secuencias aminoacídicas heterólogas, procedentes 25 de proteínas distintas de aquéllas que conforman la cápsida viral nativa. Estas VLPs se denominan genéricamente VLPs heterotípicas, recombinantes o químéricas (QVLPs). Las QVLPs han sido empleadas fundamentalmente con dos finalidades: (i) generación de 30 vacunas multivalentes, mediante péptidos heterólogos inmunogénicamente relevantes (Kingsman, A. J., N. R. Burns, G. T. Layton, and S. E. Adams. 1995. Yeast retrotransposon particles as antigen delivery systems. Ann. N. Y. Acad. Sci. 754: 202– 213; Lo-Man, R., P. Rueda, C. Sedlik, E. Deriaud, I. Casal, and C. Leclerc. 1998. A recombinant virus-like particle system derived from parvovirus as an efficient antigen carrier to elicit a polarized Th1 immune response without adjuvant. Eur. J. Immunol. 28: 1401–1407; Qiu, Z., D. Ou, H. Wu, T. C. Hobma, and S. Gillam. 1994. Expression and characterization of virus-like particles containing rubella virus structural proteins. J. Virol.

68: 4086–4091); y (ii) modificación del tropismo, mediante inserción de secuencias aminoacídicas involucradas en interacciones con receptor-ligando (Schmidt, U., Rudolf, R, and Bömh, G. 2001. Binding of external ligands onto an engineered virus capsid. *Prot. Eng.* 14: 769-774; Shin, Y.C., and Folk, W.R. 2003. Formation of polyoma virus-like 5 particles with different VP1 molecules that bind the urokinase plasminogen activator receptor. *J. Virol.* 77: 11491-11498).

Las QVLPs se obtienen, en general, mediante la expresión de la(s) proteína(s) viral(es) responsable(s) de la formación de la cápsida viral, fusionada a la región que codifica el polipéptido de interés.

10 El virus causante de la enfermedad de la bursitis infecciosa (IBDV), perteneciente a la familia Birnaviridae, infecta diferentes especies aviares y es el responsable directo de una grave enfermedad inmunosupresora causante de importantes pérdidas económicas en la industria avícola mundial.

15 Las partículas de IBDV son icosaédricas, con una simetría $T=13$, carecen de envuelta y están formadas por una única capa proteica. Hasta el momento, las aproximaciones encaminadas a la obtención un modelo atómico para las partículas de IBDV han fracasado. Por ello, la información estructural disponible está basada en modelos tridimensionales generados a partir de imágenes obtenidas por criomicroscopía electrónica del virus purificado y de VLPs. En base a esos estudios, se ha comprobado que 20 la superficie externa de la partícula está formada por un entramado continuo de 260 trímeros de la proteína VP2 (37 kDa) ordenados en cinco conformaciones diferentes. La cara interna de las partículas contiene 200 trímeros de la proteína VP3 (29 kDa), estos últimos, independientes entre sí, se encuentran unidos a la zona basal de los trímeros de VP2. Se ha sugerido que un tercer polipéptido, VP4 (28 kDa), también podría formar parte 25 de las partículas, estando situado en la base de los pentámeros que forman los vértices de la estructura icosaédrica.

30 Los polipéptidos VP2, VP3 y VP4 se producen a partir del procesamiento proteolítico de un polipéptido precursor de un tamaño de 109 kDa. Este precursor se procesa auto-catalíticamente liberando los polipéptidos pVP2 (48 kDa), VP3 y VP4. El dominio VP4, que se localiza en la región central de la poliproteína, pertenece a la familia de las proteasas Lon y es el responsable del corte proteolítico. Los polipéptidos pVP2 y VP3 son los responsables directos del ensamblaje de las cápsidas. El producto pVP2 sufre un último corte en su extremo C-terminal antes de dar lugar a la forma madura de la

proteína, VP2, que es la que se encuentra en las partículas purificadas (Da Costa, B., Chevalier, C., Henry, C., Huet, J. C., Petit, S., Lepault, J., Boot, H. & Delmas, B. (2002). The capsid of infectious bursal disease virus contains several small peptides arising from the maturation process of pVP2. *Journal of Virology* 76, 2393-2402). Este procesamiento de pVP2 es necesario para la correcta formación de las cápsidas y requiere de la presencia de VP3, aunque la proteasa responsable aún no ha sido identificada (Maraver, A., Oña, A., Abaitua, F., González, D., Clemente, R., Diaz-Ruiz, A., Caston, J. R., Pazos, F. & Rodríguez, J. F. (2003). The oligomerization domain of VP3, the scaffolding protein of infectious bursal disease virus, plays a critical role for capsid formation. *Journal of Virology* 77 :6438-49).

En líneas generales, la morfogénesis es un proceso vital para el ciclo vírico que requiere de pasos sucesivos asociados a modificaciones en los polipéptidos precursores. Por ello, los virus han desarrollado estrategias que permiten la secuencial y correcta interacción entre cada uno de sus componentes. Una de estas estrategias, utilizada con 15 frecuencia por virus icosaédricos, es la utilización de polipéptidos provenientes de una única poliproteína como base de sus componentes estructurales. En estos casos, el adecuado procesamiento proteolítico de dicha poliproteína juega un papel crucial en el proceso de ensamblaje.

En trabajos previos se ha demostrado este principio para el ensamblaje de las 20 cápsidas de IBDV (Fernández-Arias, A., Risco, C., Martínez, S., Albar, J. P. & Rodríguez, J. F. (1998). Expression of ORF A1 of infectious bursal disease virus infectious bursal disease virus results in the formation of virus-like particles. *Journal of General Virology* 79, 1047-1054). La expresión en células eucarióticas del gen codificador para la 25 poliproteína de IBDV da lugar a la formación de VLPs totalmente indistinguibles morfológica y bioquímicamente de los viriones de IBDV. Asimismo, se ha comprobado que el ensamblaje de las cápsidas necesita únicamente de la síntesis y del correcto procesamiento de la poliproteína viral, y es independiente de la presencia del genoma vírico o de otras proteínas codificadas por el genoma viral como son VP5 y VP1.

Los resultados obtenidos hasta la fecha a partir de la expresión de los genes de 30 IBDV en distintos sistemas recombinantes ha permitido concluir que: i) el proceso de ensamblaje es independiente de la presencia del material genético del virus, ii) para el ensamblaje sólo son necesarios los polipéptidos codificados por el gen de la poliproteína,

y iii) el ensamblaje requiere de una interacción coordinada entre los polipéptidos VP2 y VP3.

5 Sin embargo, hay que indicar que no se conoce si la interacción pVP2/VP3 se establece entre dominios de VP2 y VP3 de la poliproteína precursora cuando aún no ha sufrido modificaciones, o si por el contrario, esta interacción ocurre tras el procesamiento del precursor. Además, la información actual no excluye la posibilidad de que VP4 pudiera jugar un papel relevante en la morfogénesis de la cápsida. De hecho, se han descrito VLPs de IBDV formadas por ensamblaje de las proteínas VP2, VP3 y VP4 de IBDV (US 6,528,063; US 5,788,970 y JP 5194597).

10 El trabajo desarrollado por estos mismos inventores ha permitido establecer sistemas para la obtención de VLPs de IBDV empleando diferentes vectores de expresión eucariótica. Estos vectores han sido utilizados para la expresión de la poliproteína de IBDV en ausencia o presencia de la RNA polimerasa viral VP1. La caracterización bioquímica de las VLPs purificadas demuestra que contienen las proteínas pVP2, VP2 y VP3, cuando se expresa únicamente la poliproteína viral y las proteínas pVP2, VP2, VP3 y VP1 cuando se realiza la expresión simultánea de la poliproteína y la RNA polimerasa viral (Fernández-Arias, A., Risco, C., Martínez, S., Albar, J. P. & Rodríguez, J. F. (1998). Expression of ORF A1 of infectious bursal disease virus infectious bursal disease virus results in the formation of virus-like particles. *Journal of General Virology* 79: 1047-1054; Martínez-Torrecuadrada, J. L., Castón, J. R., Castro, M., Carrascosa, J. L., Rodríguez, J. F. & Casal, J. I. (2000). Different architectures in the assembly of infectious bursal disease virus capsid proteins expressed in insect cells. *Virology* 278: 322-331; Maraver, A., et al., (2003) citado *supra*; Lombardo, E., Maraver, A., Castón, J. R., Rivera, J., Fernández-Arias, A., Serrano, A., Carrascosa, J. L. & Rodríguez, J. F. (1999). VP1, the putative RNA-dependent RNA polymerase of infectious bursal disease virus, forms complexes with the capsid protein VP3, leading to efficient encapsidation into virus-like particles. *Journal of Virology* 73: 6973-6983).

25 Por otra parte, la solicitud de patente WO 02/088339 describe unas partículas pseudovirales de IBDV formadas por ensamblaje de proteínas químéricas que comprenden la poliproteína de IBDV unida en su extremo carboxilo terminal a un polipéptido.

Sin embargo, no se han descrito previamente QVLPs basadas únicamente en pVP2 y VP3 de IBDV, estando esta última proteína VP3 fusionada a un polipéptido de interés, ni su potencial como vehiculizadoras de productos de interés.

5 COMPENDIO DE LA INVENCIÓN

La invención se enfrenta con el problema de proporcionar nuevas herramientas para vectorizar o vehiculizar productos de interés, tales como moléculas con actividad biológica, por ejemplo, fármacos, polipéptidos, proteínas, ácidos nucleicos, etc.

La solución proporcionada por esta invención se basa en que es posible generar, 10 basado en la expresión simultánea de las proteínas pVP2 y VP3 de IBDV, esta última modificada genéticamente para incluir una secuencia de nucleótidos que codifica para un polipéptido heterólogo que comprende un polipéptido de interés, cápsidas vacías químéricas (QVLPs) de IBDV. Las QVLPs resultantes están formadas por ensamblaje de 15 (i) proteínas pVP2 de IBDV y (ii) proteínas de fusión que comprenden una región A constituida por la proteína VP3 de IBDV unida a una región B constituida por un polipéptido heterólogo que comprende un polipéptido de interés, en donde dicha región B está unida al extremo amino- o carboxi-terminal de dicha proteína VP3 de IBDV. Estas QVLPs pueden ser utilizadas con fines terapéuticos, preventivos, de diagnóstico, etc., por ejemplo, en la elaboración de vacunas o vectores para terapia génica.

20 Los inventores habían observado previamente que cuando las proteínas VPX (pVP2) y VP3 de IBDV son expresadas a partir de dos genes independientes se forman partículas vacías (VLPs) de IBDV. Estas VLPs son estructuralmente idénticas a las obtenidas mediante expresión de la ORF correspondiente a la poliproteína de IBDV. Como parte del desarrollo de nuevas estrategias de vacunación se analizó la posibilidad de 25 emplear esta estrategia de producción de VLPs de IBDV para la obtención de QVLPs que contuvieran secuencias aminoacídicas heterólogas, correspondientes a péptidos y proteínas de interés, tales como una cola de histidinas (Ejemplo 1), GFP (Ejemplo 2) y finalmente péptidos implicados en la inducción de respuesta inmune (Ejemplo 3). Tal como se demuestra la fusión de secuencias heterólogas en estas construcciones no es un 30 obstáculo para la formación de QVLPs.

Como modelo de estudio de QVLPs transportadoras de péptidos implicados en una respuesta inmune se abordó la posibilidad de obtener QVLPs que contuvieran la secuencia correspondiente al epítopo CD8 (E-CD8) de la proteína CS de malaria (*Plasmodium*

yoelii). Ese epítopo es responsable de la inducción de la respuesta inmune celular CD8-específica frente a ese patógeno, la cual puede ser cuantificada mediante la técnica de ELISPOT en cultivos de esplenocitos de ratones BALB/c (Ejemplo 3).

5 A modo de resumen, los resultados obtenidos ponen de manifiesto que: (i) el sistema de expresión empleado permite la obtención de QVLPs de IBDV conteniendo secuencias aminoacídicas heterólogas; y (ii) la inmunización con dichas QVLPs de IBDV induce una respuesta inmune específica frente a la secuencia aminoacídica heteróloga presente en las QVLPs.

10 Por tanto, un aspecto de la presente invención se relaciona con una cápsida vacía químérica de IBDV caracterizada porque está constituida por ensamblaje de (i) proteínas pVP2 de IBDV y (ii) proteínas de fusión que comprenden una región A constituida por la proteína VP3 de IBDV unida a una región B constituida por un polipéptido heterólogo que comprende un polipéptido de interés.

15 Un aspecto adicional de esta invención se relaciona con un procedimiento para la producción de dichas QVLPs de IBDV proporcionadas por esta invención, basado en la co-expresión génica de dichas proteínas pVP2 de IBDV y proteínas de fusión como dos genes independientes.

20 Los ácidos nucleicos, construcciones génicas, sistemas de expresión y células huésped desarrollados para la puesta en práctica de dicho procedimiento de producción de dichas QVLPs de IBDV, así como su empleo para la producción de dichas QVLPs de IBDV, constituyen aspectos adicionales de la presente invención.

25 Dichas QVLPs de IBDV tienen la capacidad de vectorizar o vehiculizar productos de interés, tales como moléculas con actividad biológica, por ejemplo, fármacos, polipéptidos, proteínas, ácidos nucleicos, etc. En una realización particular, dichas QVLPs de IBDV pueden vehiculizar antígenos e inductores de respuestas inmunes en animales o humanos a los que se suministre, por lo que pueden ser utilizadas en la elaboración de vacunas frente a enfermedades humanas y animales causadas por virus, bacterias, parásitos o cualquier otro tipo de microorganismos o frente enfermedades tumorales. En otra realización particular, dichas QVLPs de IBDV se utilizan en la elaboración de vectores para terapia génica.

30 Por tanto, en otro aspecto adicional, la presente invención se relaciona con el empleo de dichas QVLPs de IBDV, en la elaboración de medicamentos, tales como

vacunas y vectores para terapia génica. Dichas vacunas y vectores constituyen aspectos adicionales de la presente invención.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

5 **Figura 1.** (a) El diagrama esquematiza los pasos de procesamiento proteolítico necesarios para la formación de las proteínas maduras de la cápsida VP2 y VP3 a partir de la poliproteína precursora. (b) El diagrama refleja diferentes construcciones genéticas derivadas de la poliproteína de IBDV descritas hasta el momento, así como las estructuras producidas mediante su expresión en diferentes sistemas heterólogos. Los números 10 indican la posición correspondiente al primer y último residuo aminoacídico de la poliproteína presente en cada una de las construcciones. La parte inferior de la figura muestra imágenes obtenidas mediante microscopía electrónica de transmisión de las estructuras obtenidas mediante expresión de las diferentes construcciones. La barra corresponde a 50 nm. Los datos han sido tomados de las siguientes referencias: 15 Fernández-Arias *et al.*, (1998), citado *supra*; Maraver *et al.*, (2003), citado *supra*; Martínez-Torrecuadrada *et al.*, (2000), citado *supra*; Castón *et al.*, 2001. C terminus of infectious bursal disease virus major capsid protein VP2 is involved in definition of the t number for capsid assembly. *Journal of Virology* 75, 10815-10828.

20 **Figura 2. Análisis microscópico de células de insecto H5 que coexpresan pVP2 y VP3.** La distribución subcelular de las proteínas pVP2 y VP3 fue analizada mediante inmunomicroscopía confocal. Células infectadas con los rBVs FB/pVP2 (a), FB/VP3 (b), o FBD/pVP2-VP3 (c-e) fueron incubadas con suero de conejo anti-pVP2 y suero de rata anti-VP3. A continuación las células fueron incubadas con suero de cabra anti-Ig de conejo acoplada a Alexa 488 (rojo) y con suero de cabra anti-Ig de rata acoplada a Alexa 594 (verde). Los núcleos se tiñeron con To-Pro 3 (azul). (e) Superposición de las imágenes mostradas en los paneles (c) y (d). Imágenes de microscopía electrónica correspondientes a secciones de células H5 infectadas con diferentes construcciones genéticas derivadas de la poliproteína de IBDV. (f) Imagen a baja magnificación de una célula H5 infectada con virus FB parental. El inserto corresponde a un detalle ampliado 25 del área indicada por el recuadro. (g) Imagen a baja magnificación de una célula H5 infectada con el virus FBD/pVPX-VP3. El inserto corresponde a un detalle ampliado del área indicada por el recuadro. (h) Imagen de alta magnificación de una célula H5 infectada con el virus FBD/pVPX-VP3 que muestra en detalle la formación de estructuras de IBDV.

(i) Imagen de alta magnificación de una célula BSC1 infectada con el virus vacunal recombinante VTLacOI/POLY mostrando estructuras similares a las detectadas en el panel (h). Las barras indican 600 nm (paneles f y g) y 200 nm (paneles h e i).

Figura 3. Caracterización estructural y bioquímica de las estructuras derivadas de IBDV producidas en células de insecto co-infectadas con los baculovirus recombinantes (rBV) FB/pVP2 + FB/his-VP3. Células co-infectadas con los rBV FB/pVP2 y FB/his-VP3, o infectadas con el virus FBD/Poly-VP1 o FB/pVP2 fueron empleadas para purificar estructuras derivadas de IBDV mediante centrifugación en gradientes de sacarosa. Los paneles (a), (b), y (c) muestran imágenes de microscopía electrónica de transmisión correspondientes a la fracción 4 de los gradientes obtenidos a partir de las infecciones con FBD/Poly-VP1, FB/pVP2+FB/his-VP3, y FB/pVP2, respectivamente. El panel (d) muestra los resultados de un análisis mediante Western blot de los gradientes de sacarosa correspondientes a cultivos infectados con FBD/Poly-VP1 y FB/pVP2+FB/his-VP3, respectivamente. Los extractos totales (input) y las diferentes fracciones de los gradientes de sacarosa (la fracción F1 corresponde al fondo del gradiente) fueron analizadas mediante Western blot empleando sueros específicos frente a las proteínas VP1, pVP2, VP3, y VP4 de IBDV, respectivamente. Se indica la masa molecular en kDa de los polipéptidos inmunoreactivos.

Figura 4. Caracterización bioquímica y estructural de VLPs de IBDV producidas en *S. cerevisiae* transformadas con el plásmido pESCURA/pVP2-VP3-GFP. Un cultivo de *S. cerevisiae* transformada con el plásmido pESCURA/pVP2-VP3-GFP fue crecido a 30°C en medio suplementado con el inductor galactosa. A las 18 h el cultivo fue recogido y centrifugado. El sedimento resultante fue procesado mediante fraccionamiento en un gradiente lineal 25-50% de sacarosa. A) Análisis bioquímico de muestras correspondientes al sedimento antes de fraccionar (T) así como de las diferentes fracciones del gradiente de sacarosa. Las muestras fueron analizadas mediante SDS-PAGE y western blot empleando anticuerpos específicos frente a las proteínas VP3 (anti-VP3) y pVP2 (anti-pVP2). Las flechas indican las posiciones de las bandas inmunoreactivas correspondientes a las proteínas VP3-GFP (61 kDa) y pVP2 (48 kDa), respectivamente. B) El análisis estructural de las muestras obtenidas fue realizado mediante TEM. La imagen corresponde a una micrografía obtenida a partir de una alicuota correspondiente a la mezcla de las fracciones 7, 8 y 9 del gradiente de sacarosa. La muestra fue teñida con acetato de uranilo y observada mediante TEM. La barra

corresponde a 65 nm. C) Muestra de VLPs obtenidas mediante la expresión de la poliproteína de IBDV en células de mamífero mediante infección con el virus vacunal recombinante VT7/Poly (Fernández-Arias *et al.*, (1998), citado *supra*). La barra corresponde a 65 nm.

5 **Figura 5.- Caracterización estructural y bioquímica de QVLPs-CD8.** El panel A muestra una imagen de TEM de una muestra teñida con acetato de uranilo correspondiente a la fracción 4 de un gradiente de sacarosa empleado para la purificación de estructuras realizado sobre un extracto de células de insecto co-infectadas con los rBVs FB/pVP2 y PF/his-CD8-VP3. La barra indica 100 nm. El panel B muestra el análisis por 10 SDS-PAGE y Western blot, realizado con un anticuerpo frente a la proteína VP3, de una muestra correspondiente a la fracción 4 (QVLPs-CD8) de un gradiente de sacarosa empleado para la purificación de estructuras realizado sobre un extracto de células de insecto co-infectadas con los rBVs FB/pVP2 y PF/his-CD8-VP3 (ver panel A). Como control se empleó una muestra de virus IBDV purificado (IBDV). Se indican los tamaños 15 de los marcadores de masa molecular (MW), así como la masa molecular estimada para las proteínas VP3 y his-CD8-VP3.

20 **Figura 6.- Efecto potenciador de la respuesta inmune celular específica anti-CD8 de malaria mediante la inmunización con QVLPs de IBDV que contienen el epítopo CD8 de *Plasmodium yoelii*.** Grupos de 4 ratones de la cepa BALB/c se inocularon intraperitonealmente con 50 µg/ratón de QVLPs-CD8 (grupo IV) o VLPs no químéricas (grupo III). Como control se inoculó un grupo con VVpJRCS (10^7 ufp/ratón), un virus vaccinia recombinante que expresa la proteína completa CS de *Plasmodium yoelii* (grupo II). 15 días después, los ratones de todos los grupos se inmunizaron intraperitonealmente con VVpJRCS (10^7 ufp/ratón). Uno de los grupos recibió en este 25 momento una única dosis del vector viral (grupo I). 15 días después de la segunda inmunización, los animales fueron sacrificados, se extrajo el bazo y se llevó a cabo el ELISPOT frente al péptido CD8 de malaria. El panel A muestra la imagen de los pocios de ELISPOT realizados con diferentes concentraciones de esplenocitos obtenidos a partir de los ratones pertenecientes a cada uno de los grupos tras su incubación en presencia (+ péptido CD8) o ausencia (- péptido CD8) del péptido CD8. El panel B muestra una gráfica 30 de los resultados obtenidos como número de células específicas secretoras de IFN- γ /10⁶ esplenocitos.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

En un primer aspecto, la invención proporciona una cápsida vacía químérica del virus causante de la enfermedad de la bursitis infecciosa (IBDV), en adelante QVLP de la invención, caracterizada porque está constituida por ensamblaje de (i) proteínas pVP2 de IBDV y (ii) proteínas de fusión que comprenden una región A constituida por la proteína VP3 de IBDV unida a una región B constituida por un polipéptido heterólogo que comprende un polipéptido de interés.

El término “IBDV”, tal como se utiliza en la presente invención, se refiere a las diferentes cepas de IBDV pertenecientes a cualquiera de los serotipos (1 ó 2) conocidos [a 10 título ilustrativo véase la revisión realizada por van den Berg TP, Eterradosi N, Toquin D, Meulemans G., en *Rev Sci Tech* 2000 19: 509-43] y los términos “proteína pVP2 de IBDV” y “proteína VP3 de IBDV” se refieren a las diferentes formas de las proteínas pVP2 y VP3 representativas de cualquiera de las mencionadas cepas de IBDV [NCBI protein databank], de acuerdo con la definición realizada por Sánchez y Rodríguez (1999) 15 (Sánchez AB, Rodríguez JF. Proteolytic processing in infectious bursal disease virus: identification of the polyprotein cleavage sites by site-directed mutagenesis. *Virology*. 1999 Sep 15; 262(1):190-199) así como a proteínas sustancialmente homólogas a dichas proteínas pVP2 y VP3 de IBDV, es decir, proteínas cuyas secuencias de aminoácidos tienen un grado de identidad, respecto a dichas proteínas pVP2 y VP3 de IBDV, de, al 20 menos, un 60%, preferentemente de, al menos un 80%, más preferentemente de, al menos, un 90% y, aún más preferentemente de, al menos, un 95%.

La proteína pVP2 de IBDV presente en la QVLP de la invención puede ser cualquier proteína pVP2 representativa de cualquier cepa de IBDV, por ejemplo, la proteína pVP2, longitud completa, de IBDV cepa Soroa [NCBI, número de acceso 25 AAD30136].

La proteína de fusión presente en la QVLP de la invención comprende una región A constituida por la proteína VP3 de IBDV unida a una región B constituida por un polipéptido heterólogo que comprende un polipéptido de interés. En una realización particular, dicha región B está unida a la región amino-terminal o a la región carboxi-terminal de dicha proteína VP3 de IBDV.

La proteína VP3 de IBDV, que constituye la región A de dicha proteína de fusión puede ser cualquier proteína VP3 representativa de cualquier cepa de IBDV, por ejemplo,

la proteína VP3, longitud completa, de IBDV cepa Soroa [NCBI, número de acceso AAD30136].

La región B presente en dicha proteína de fusión está constituida por un polipéptido heterólogo que comprende un polipéptido de interés. Tal como se utiliza en la 5 presente invención el término "polipéptido heterólogo" se refiere a un polipéptido no propio de la cápsida de IBDV nativo. El tamaño del polipéptido de interés puede variar dentro de un amplio intervalo, desde unos pocos aminoácidos hasta cientos de aminoácidos. Dicho polipéptido de interés puede ser prácticamente cualquier polipéptido, independientemente de su origen (eucarótico, procariótico, viral, etc.), susceptible de ser 10 expresado de forma recombinante. No obstante, en una realización particular, dicho polipéptido de interés es un polipéptido útil en vacunación, terapia o diagnóstico, tal como un epítopo o determinante antigénico capaz de inducir una respuesta inmune en animales y humanos frente a enfermedades causadas por virus, bacterias, parásitos o cualquier otro tipo de microorganismos o frente a enfermedades tumorales.

15 En una realización particular, dicha región B comprende un único polipéptido de interés. Sin embargo, en otra realización particular, dicha región B comprende dos o más polipéptidos de interés, iguales o diferentes, los cuales pueden estar formando tándems.

En una realización particular, dicha proteína de fusión comprende una región A unida a una única región B. En este caso, dicha región B puede estar unida a la región 20 amino-terminal de la VP3 o, alternativamente, a la región carboxi-terminal de VP3, presente en la región A. La región B, tal como se ha mencionado previamente, puede contener uno o más polipéptidos de interés. En una realización particular, dicha región B contiene un único polipéptido de interés mientras que en otra realización particular, dicha región B comprende dos o más polipéptidos de interés diferentes.

25 En otra realización particular, dicha proteína de fusión comprende una región A unida a dos regiones B, una de ellas unida a la región amino-terminal de la VP3 presente en la región A y la otra a la región carboxi-terminal de VP3 presente en la región A. Dichas regiones B pueden ser iguales o diferentes y cada una de ellas puede contener uno o más polipéptidos de interés, los cuales pueden ser iguales o diferentes entre sí. En una realización concreta, la proteína de fusión comprende una región A unida a una primera 30 región B que contiene un primer polipéptido de interés (B1) y una segunda región B que contiene un segundo polipéptido de interés (B2). Dichos polipéptidos de interés (B1) y (B2) pueden ser iguales o diferentes. En una realización concreta, dichos polipéptidos de

interés (B1) y (B2) son distintos entre sí.

Generalmente, la región A (constituida por la proteína VP3 de IBDV) no está unida directamente a dicha región B (constituida por el polipéptido heterólogo que comprende un polipéptido de interés), sino a través de un polipéptido espaciador (linker) entre dichas regiones A y B. Por tanto, si se desea, la proteína de fusión de la invención puede contener, además, un polipéptido espaciador situado entre dichas regiones A y B. Ventajosamente, dicho polipéptido espaciador es un péptido con flexibilidad estructural, preferentemente, un polipéptido que dé lugar a un dominio no estructurado capaz o no de inducir una respuesta inmune. A modo ilustrativo, dicho péptido flexible puede contener 5 repeticiones de restos de aminoácidos, en particular de restos de Gly y Ser o cualquier otra 10 repetición de restos de aminoácidos adecuada.

Las QVLPs de la invención pueden obtenerse mediante la expresión simultánea de dichas proteínas pVP2 de IBDV y dichas proteínas de fusión que comprenden dichas regiones A y B, en células huésped apropiadas. Dichas células huésped apropiadas son 15 células que contienen la secuencia de nucleótidos codificantes de dicha proteína de fusión que comprende las regiones A y B, y la secuencia de nucleótidos codificante de la pVP2 de IBDV, bien en una única construcción génica o bien en dos construcciones génicas. En una realización particular, dichas células huésped apropiadas son células transformadas, transfectadas o infectadas con un sistema de expresión adecuado, tal como un sistema de 20 expresión que comprende una construcción génica, en donde dicha construcción génica comprende la secuencia de nucleótidos que codifica para dicha proteína de fusión que comprende las regiones A y B, y la secuencia de nucleótidos que codifica para la pVP2 de IBDV, o bien, alternativamente, con un sistema de expresión que comprende una primera construcción génica que comprende la secuencia de nucleótidos que codifica para dicha 25 proteína de fusión que comprende las regiones A y B, y una segunda construcción génica que comprende la secuencia de nucleótidos que codifica para la pVP2 de IBDV.

Por tanto, en otro aspecto, la invención proporciona un ácido nucleico cuya secuencia de nucleótidos comprende la secuencia de nucleótidos que codifica para dicha proteína de fusión que forma parte de las QVLPs de la invención y que comprende una 30 región A constituida por la proteína VP3 de IBDV unida a una región B constituida por un polipéptido heterólogo que comprende un polipéptido de interés, en donde dicha región B unida a la región amino-terminal o a la región carboxi-terminal de dicha proteína VP3 de IBDV. Opcionalmente, el ácido nucleico proporcionado por esta invención puede

contener, si se desea, la secuencia de nucleótidos que codifica para la pVP2 de IBDV. De forma más concreta, en una realización particular, la secuencia del ácido nucleico proporcionado por esta invención comprende (i) una secuencia de nucléotidos que comprende la fase de lectura abierta o región codificante correspondiente a la proteína 5 VP3 de IBDV, y (ii) una secuencia de nucleótidos que comprende la fase de lectura abierta o región codificante de uno o más polipéptidos heterólogos que comprende uno o más polipéptidos de interés y, opcionalmente, si se desea, (iii) una secuencia de nucléotidos que comprende la fase de lectura abierta o región codificante correspondiente a la proteína pVP2 de IBDV.

10 En otra realización particular, la secuencia del ácido nucleico proporcionado por esta invención comprende una (i) una secuencia de nucléotidos que comprende la fase de lectura abierta o región codificante correspondiente a la proteína VP3 de IBDV, (ii) una primera secuencia de nucleótidos que comprende la fase de lectura abierta o región codificante de uno o más polipéptidos heterólogos que comprende uno o más polipéptidos 15 de interés, (ii') una segunda secuencia de nucleótidos que comprende la fase de lectura abierta o región codificante de uno o más polipéptidos heterólogos que comprende uno o más polipéptidos de interés, en donde dicha segunda secuencia de nucleótidos puede ser igual o diferente a dicha primera secuencia de nucleótidos, y, opcionalmente, si se desea, (iii) una secuencia de nucléotidos que comprende la fase de lectura abierta o región 20 codificante correspondiente a la proteína pVP2 de IBDV. En este caso, una de dichas primera o segunda secuencia de nucleótidos está operativamente unida al extremo 5' de la secuencia de nucléotidos que comprende la fase de lectura abierta o región codificante correspondiente a la proteína VP3 de IBDV y la otra está operativamente unida al extremo 3' de la secuencia de nucléotidos que comprende la fase de lectura abierta o región 25 codificante correspondiente a la proteína VP3 de IBDV.

Tal como se utiliza en esta descripción, el término "fase de lectura abierta correspondiente a la proteína pVP2" o "fase de lectura abierta correspondiente a la proteínas VP3 de IBDV" incluye, además de las secuencias de nucleótidos de dichas fases de lectura abierta, otras fases de lectura abiertas análogas a las mismas codificantes de las 30 proteínas pVP2 y VP3 de IBDV. Asimismo, el término "fase de lectura abierta de uno o más polipéptidos heterólogos que comprenden uno o más polipéptidos de interés" incluye cualquier secuencia de nucleótidos codificante de dicho(s) polipéptido(s) heterólogo(s) que comprende(n) uno o más polipéptidos de interés. El término "análoga", tal como aquí

se utiliza, pretende incluir cualquier secuencia de nucleótidos que puede ser aislada o construida sobre la base de la secuencia de nucleótidos codificantes de pVP2 y VP3 de IBDV, por ejemplo, mediante la introducción de sustituciones de nucleótidos conservativas o no conservativas, incluyendo la inserción de uno o más nucleótidos, la 5 adición de uno o más nucleótidos en cualquiera de los extremos de la molécula o la delección de uno o más nucleótidos en cualquier extremo o en el interior de la secuencia. En general, una secuencia de nucleótidos análoga a otra secuencia de nucleótidos es sustancialmente homóloga a dicha secuencia de nucleótidos. En el sentido utilizado en esta descripción, la expresión "sustancialmente homóloga" significa que las secuencias de 10 nucleótidos en cuestión tienen un grado de identidad, a nivel de nucleótidos, de, al menos, un 60%, preferentemente de, al menos, un 80%, más preferentemente de, al menos, un 90% y, aún más preferentemente de, al menos, un 95%.

En otro aspecto, la invención proporciona una construcción génica que comprende un ácido nucleico proporcionado por esta invención, es decir, un ácido nucleico cuya 15 secuencia comprende la secuencia de nucleótidos que codifica para dicha proteína de fusión que comprende las regiones A y B, y, opcionalmente, la secuencia de nucleótidos que codifica para dicha proteína pVP2 de IBDV. De forma más concreta, en una realización particular, la construcción génica proporcionada por esta invención comprende una secuencia de nucléotidos que comprende (i) una secuencia de nucléotidos que comprende la fase de lectura abierta o región codificante correspondiente a la proteína VP3 de IBDV y (ii) una secuencia de nucleótidos que comprende la fase de lectura abierta o región codificante de uno o más polipéptidos heterólogos que comprenden uno o más polipéptidos de interés, y, opcionalmente, si se desea, (iii) una secuencia de nucléotidos que comprende la fase de lectura abierta o región codificante correspondiente a la proteína 20 pVP2 de IBDV. En otra realización particular, la construcción génica proporcionada por esta invención comprende una secuencia de nucleótidos que comprende una (i) una secuencia de nucléotidos que comprende la fase de lectura abierta o región codificante correspondiente a la proteína VP3 de IBDV, (ii) una primera secuencia de nucleótidos que comprende la fase de lectura abierta o región codificante de uno o más polipéptidos 25 heterólogos que comprende uno o más polipéptidos de interés, (ii') una segunda secuencia de nucleótidos que comprende la fase de lectura abierta o región codificante de uno o más polipéptidos heterólogos que comprende uno o más polipéptidos de interés, en donde dicha segunda secuencia de nucleótidos puede ser igual o diferente a dicha primera 30

secuencia de nucleótidos, y, opcionalmente, si se desea, (iii) una secuencia de nucléótidos que comprende la fase de lectura abierta o región codificante correspondiente a la proteína pVP2 de IBDV. En este caso, una de dichas primera o segunda secuencia de nucleótidos está operativamente unida al extremo 5' de la secuencia de nucléótidos que comprende la 5 fase de lectura abierta o región codificante correspondiente a la proteína VP3 de IBDV y la otra está operativamente unida al extremo 3' de la secuencia de nucléótidos que comprende la fase de lectura abierta o región codificante correspondiente a la proteína VP3 de IBDV.

En otro aspecto, la invención proporciona un sistema o vector de expresión 10 seleccionado entre:

- a) un sistema de expresión que comprende una construcción génica proporcionada por esta invención, operativamente unida a unos elementos de control de transcripción y, opcionalmente, de traducción, en donde dicha construcción génica comprende la secuencia de nucleótidos que codifica para 15 dicha proteína de fusión que comprende las regiones A y B, y la secuencia de nucleótidos que codifica para la proteína pVP2 de IBDV; y
- b) un sistema de expresión que comprende una primera construcción génica proporcionada por esta invención, operativamente unida a unos elementos de control de transcripción y, opcionalmente, de traducción, en donde dicha 20 primera construcción comprende la secuencia de nucleótidos que codifica para dicha proteína de fusión que comprende las regiones A y B, y una segunda construcción génica, operativamente unida a unos elementos de control de transcripción y, opcionalmente, de traducción, que comprende la secuencia de nucleótidos que codifica para la proteína pVP2 de IBDV.

En una realización particular, el sistema de expresión proporcionado por esta 25 invención comprende una construcción génica que comprende (i) una secuencia de nucléótidos que comprende la fase de lectura abierta o región codificante correspondiente a la proteína VP3 de IBDV, (ii) una secuencia de nucleótidos que comprende la fase de lectura abierta o región codificante de uno o más polipéptidos heterólogos que 30 comprenden uno o más polipéptidos de interés, y (iii) una secuencia de nucléótidos que comprende la fase de lectura abierta o región codificante correspondiente a la proteína pVP2 de IBDV, en donde dicha construcción génica está operativamente unida a unos elementos de control de transcripción y, opcionalmente, de traducción.

En otra realización particular, el sistema de expresión proporcionado por esta invención comprende una primera construcción génica, operativamente unida a unos elementos de control de transcripción y, opcionalmente, de traducción, comprendiendo dicha primera construcción génica (i) una secuencia de nucléotidos que comprende la fase de lectura abierta o región codificante correspondiente a la proteína VP3 de IBDV, y (ii) una secuencia de nucleótidos que comprende la fase de lectura abierta o región codificante de uno o más polipéptidos heterólogos que comprenden uno o más polipéptidos de interés, y una segunda construcción génica, operativamente unida a unos elementos de control de transcripción y, opcionalmente, de traducción, comprendiendo dicha segunda construcción génica una secuencia de nucléotidos que comprende la fase de lectura abierta o región codificante correspondiente a la proteína pVP2 de IBDV.

Los elementos de control de transcripción y, opcionalmente, de traducción, presentes en el sistema de expresión proporcionado por esta invención incluyen promotores, que dirigen la transcripción de las secuencias de nucleótidos de interés (pVP2, VP3 y polipéptido heterólogo) al que está operativamente enlazado, y otras secuencias necesarias o apropiadas para la transcripción y su regulación adecuada en tiempo y lugar, por ejemplo, señales de inicio y terminación, sitios de corte, señal de poliadenilación, origen de replicación, activadores transcripcionales (enhancers), silenciadores transcripcionales (silencers), etc.

Prácticamente cualquier sistema o vector de expresión apropiado puede ser utilizado en la generación del sistema de expresión proporcionado por esta invención. A modo ilustrativo, dichos sistemas o vectores de expresión apropiados pueden seleccionarse de acuerdo con las condiciones y necesidades de cada caso concreto entre plásmidos, bácmidos, cromosomas artificiales de levadura (YACs), cromosomas artificiales de bacteria (BACs), cromosomas artificiales basados en el bacteriófago P1 (PACs), cósmidos, o virus, que pueden contener, además, un origen de replicación heterólogo, por ejemplo, bacteriano o de levadura para que pueda ser amplificado en bacterias o levaduras, así como un marcador utilizable para seleccionar las células transfectadas diferente al gen o genes de interés. Estos sistemas o vectores de expresión pueden ser obtenidos por métodos convencionales conocidos por los técnicos en la materia [Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. (1989). Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory] y forman parte de la presente invención. En una realización particular, dicho sistema o vector de expresión es un

plásmido, tal como un plásmido adecuado para transformar levaduras, por ejemplo, el plásmido denominado pESCURA/pVP2-VP3-GFP (Ejemplo 2), o un virus, tal como un baculovirus recombinante (rBV), por ejemplo, el rBV denominado FBD/pVP2-his-VP3 (Ejemplo 1.2), que expresa durante su ciclo de replicación ambas proteínas (pVP2 de IBDV e his-VP3) simultáneamente en células de insecto, o los rBVs denominados FB/pVP2 y FB/his-VP3 (Ejemplo 1.1) que expresan las proteínas pVP2 de IBDV e his-VP3, respectivamente, cuando co-infectan células de insecto, obteniéndose QVLPs de IBDV con el polipéptido heterólogo de seis histidinas (6 his), o los rBVs denominados FB/pVP2 y FB/his-CD8-VP3 (Ejemplo 3) que expresan las proteínas pVP2 de IBDV e his-CD8-VP3, respectivamente, cuando co-infectan células de insecto, formándose las cápsidas denominadas QVLPs-CD8.

En otro aspecto, la invención proporciona una célula huésped que contiene la secuencia de nucleótidos codificantes de dicha proteína de fusión que comprende las regiones A y B, y la secuencia de nucleótidos codificante de la proteína pVP2 de IBDV, bien en una única construcción génica o bien en dos construcciones génicas diferentes. En una realización particular, dicha célula huésped es una célula huésped transformada, transfectada o infectada con (i) un sistema de expresión proporcionado por esta invención que comprende bien una construcción génica, en donde dicha construcción génica comprende la secuencia de nucleótidos que codifica para dicha proteína de fusión que comprende las regiones A y B, y la secuencia de nucleótidos que codifica para la proteína pVP2 de IBDV, o bien, alternativamente, con (ii) un sistema de expresión que comprende una primera construcción génica que comprende la secuencia de nucleótidos que codifica para dicha proteína de fusión que comprende las regiones A y B, y una segunda construcción génica que comprende la secuencia de nucleótidos que codifica para la proteína pVP2 de IBDV.

En una realización particular, la célula huésped proporcionada por esta invención es una célula huésped transformada, transfectada o infectada con un sistema de expresión que comprende una construcción génica que comprende (i) una secuencia de nucléotidos que comprende la fase de lectura abierta o región codificante correspondiente a la proteína VP3 de IBDV, (ii) una secuencia de nucleótidos que comprende la fase de lectura abierta o región codificante de un polipéptido heterólogo que comprende un polipéptido de interés, y (iii) una secuencia de nucléotidos que comprende la fase de lectura abierta o región codificante correspondiente a la proteína pVP2 de IBDV, en donde dicha

construcción génica está operativamente unida a unos elementos de control de transcripción y, opcionalmente, de traducción.

En otra realización particular, la célula huésped proporcionada por esta invención es una célula huésped transformada, transfectada o infectada con (a) una primera 5 construcción génica, operativamente unida a unos elementos de control de transcripción y, opcionalmente, de traducción, comprendiendo dicha primera construcción génica (i) una secuencia de nucléotidos que comprende la fase de lectura abierta o región codificante correspondiente a la proteína VP3 de IBDV, y (ii) una secuencia de nucleótidos que comprende la fase de lectura abierta o región codificante de un polipéptido heterólogo que 10 comprende un polipéptido de interés, y con (b) una segunda construcción génica, operativamente unida a unos elementos de control de transcripción y, opcionalmente, de traducción, comprendiendo dicha segunda construcción génica una secuencia de nucléotidos que comprende la fase de lectura abierta o región codificante correspondiente a la proteína pVP2 de IBDV.

15 Prácticamente cualquier célula huésped susceptible de ser transformada, transfectada o infectada por un sistema de expresión proporcionado por esta invención puede ser utilizada, por ejemplo, células de mamífero, células aviares, células de insecto, levaduras, etc.; no obstante, en una realización particular, dicha célula huésped se selecciona entre levaduras y células de insecto. Las levaduras son adecuadas por razones 20 de simplicidad y coste de producción. Las células de insecto son adecuadas cuando el sistema de expresión comprende uno o dos baculovirus recombinantes (rBV). El empleo de rBV es ventajoso por cuestiones de bioseguridad relacionadas con el rango de huésped de los baculovirus, incapaces de replicar en otros tipos celulares que no sean de insecto.

25 En una realización particular, la invención proporciona una célula huésped, tal como una levadura, por ejemplo, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces pombe*, etc., transformada con un sistema de expresión, tal como un plásmido o un vector de expresión, que comprende una construcción génica proporcionada por esta invención que comprende la secuencia de nucleótidos que codifica para dicha proteína de fusión que comprende las regiones A y B, y la secuencia de nucleótidos que codifica para la proteína pVP2 de 30 IBDV.

En otra realización particular, la invención proporciona una célula huésped, tal como una célula de insecto, infectada con un sistema de expresión, tal como un baculovirus recombinante, que comprende una construcción génica proporcionada por

esta invención que comprende la secuencia de nucleótidos que codifica para dicha proteína de fusión que comprende las regiones A y B, y la secuencia de nucleótidos que codifica para la proteína pVP2 de IBDV.

En otra realización particular, la invención proporciona una célula huésped, tal como una célula de insecto, co-infectada con un sistema de expresión que comprende un primer baculovirus recombinante que comprende una construcción génica proporcionada por esta invención que comprende la secuencia de nucleótidos que codifica para dicha proteína de fusión que comprende las regiones A y B, y con un segundo baculovirus recombinante que comprende una construcción génica proporcionada por esta invención que comprende la secuencia de nucleótidos que codifica para la proteína pVP2 de IBDV.

En otro aspecto, la invención proporciona un procedimiento para la producción de QVLPs de la invención que comprende cultivar una célula huésped proporcionada por esta invención que contiene la secuencia de nucleótidos codificantes de dicha proteína de fusión que comprende las regiones A y B, y la secuencia de nucleótidos codificante de la pVP2 de IBDV, bien en una única construcción génica o bien en dos construcciones génicas diferentes, y que expresa simultáneamente dichas proteínas pVP2 de IBDV y proteína de fusión que comprende dichas regiones A y B, y, si se desea, recuperar dichas QVLPs de la invención. En una realización particular, dicha célula huésped proporcionada por esta invención es una célula transformada, transfectada o infectada con un sistema de expresión adecuado, tal como un sistema de expresión que comprende una construcción génica, en donde dicha construcción génica comprende la secuencia de nucleótidos que codifica para dicha proteína de fusión que comprende las regiones A y B, y la secuencia de nucleótidos que codifica para la pVP2 de IBDV, o bien, alternativamente, con un sistema de expresión que comprende una primera construcción génica que comprende la secuencia de nucleótidos que codifica para dicha proteína de fusión que comprende las regiones A y B, y una segunda construcción génica que comprende la secuencia de nucleótidos que codifica para la pVP2 de IBDV.

Dicho procedimiento comprende, por tanto, la co-expresión génica de dichas proteínas pVP2 de IBDV y dichas proteínas de fusión que comprenden las regiones A y B como dos genes independientes. Tras la expresión simultánea de dichas proteínas (pVP2 de IBDV y las proteínas de fusión que comprenden las regiones A y B) en dichas células, las proteínas expresadas se ensamblan y forman las QVLPs de la invención, las cuales pueden ser aisladas o retiradas del medio, y, si se desea, purificadas. El aislamiento y

purificación de dichas QVLPs de la invención puede realizarse por métodos convencionales, por ejemplo, mediante fraccionamiento en gradientes de sacarosa.

En una realización particular, la co-expresión génica de las proteínas pVP2 de IBDV, y las proteínas de fusión que comprenden dichas regiones A y B, se realiza mediante el empleo de un rBV que permite la expresión simultánea de dichas proteínas a partir de dos genes quiméricos independientes en células de insecto. En este caso, el procedimiento para la producción de QVLPs de la invención, proporcionado por esta invención, comprende, en primer lugar, la obtención de un sistema de expresión génica constituido por un rBV que contiene una construcción génica que codifica simultáneamente para las proteínas pVP2 de IBDV y para dichas proteínas de fusión que comprenden dichas regiones A y B, tal como el rBV denominado FBD/pVP2-his-VP3 (Ejemplo 1.2) o bien, alternativamente, la obtención de un rBV que contiene una construcción genica que codifica para la proteína pVP2 de IBDV y la obtención de otro rBV que contiene una construcción génica que codifica para dicha proteína de fusión que comprende dichas regiones A y B, tal como los rBVs denominados FB/pPV2 y FB/his-VP3 (Ejemplo 1.1), o rBVs denominados FB/pPV2 y FB/his-CD8-VP3 (Ejemplo 3), respectivamente, seguido de la infección de células de insecto con dicho sistema de expresión basado en dicho(s) baculovirus recombinante(s), expresión de las proteínas recombinantes y, si se desea, aislamiento de las QVLPs de la invención formadas por ensamblaje de dichas proteínas pVP2 de IBDV y proteínas de fusión que comprenden dichas regiones A y B, y, opcionalmente, purificación posterior de dichas QVLPs de la invención.

La construcción de un baculovirus recombinante que permite la expresión de forma independiente de las proteínas pVP2 de IBDV y las proteínas de fusión que comprenden dichas regiones A y B se puede realizar por cualquier experto en la materia en base a lo a qui descrito y al estado de la técnica sobre esta tecnología (Cold Spring Harbor, N.Y.; Leusch MS, Lee SC, Olins PO. 1995. A novel host-vector system for direct selection of recombinant baculoviruses (bacmids) in *Escherichia coli*. Gene 160: 191-4; Luckow VA, Lee SC, Barry GF, Olins PO. 1993. Efficient generation of infectious recombinant baculoviruses by site-specific transposon-mediated insertion of foreign genes into a baculovirus genome propagated in *Escherichia coli*. J Virol 67: 4566-79).

En otra realización particular, la co-expresión génica de las proteínas pVP2 de IBDV y de las proteínas de fusión que comprenden las regiones A y B previamente

definidas, se realiza mediante el empleo de un vector que permite la expresión de dichas proteínas en células de levadura. En este caso, el procedimiento para la producción de QVLPs de la invención, proporcionado por esta invención, comprende, en primer lugar, la obtención de un sistema de expresión génica constituido por un plásmido que contiene una 5 construcción génica que codifica simultáneamente para las proteínas pVP2 de IBDV y para dichas proteínas de fusión que comprenden dichas regiones A y B, seguido de la transformación de levaduras con dicho sistema de expresión, expresión de las proteínas recombinantes y, si se desea, aislamiento de las QVLPs de la invención formadas por ensamblaje de dichas proteínas pVP2 de IBDV y proteínas de fusión que comprenden 10 dichas regiones A y B, y, opcionalmente, purificación posterior de dichas QVLPs de la invención. En una realización concreta, el sistema de expresión adecuado para transformar levaduras está basado en un sistema de expresión pESC Yeast (Stratagene) tal como, por ejemplo, el plásmido pESCURA/pVP2/VP3-GFP (Ejemplo 2) que contiene una construcción génica que codifica para las proteínas pVP2 de IBDV y VP3-GFP.

15 La obtención de levaduras transformadas con una construcción génica o con un sistema o vector de expresión apropiado que permite la expresión simultánea de las proteínas pVP2 de IBDV y las proteínas de fusión que comprenden dichas regiones A y B, se puede realizar por cualquier experto en la materia en base a lo aquí descrito y al estado de la técnica sobre esta tecnología (pESC epitope tagging vectors Instructions manual).

20 Stratagene www.stratagene.com; Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. (1989). Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory).

En otro aspecto, la invención se relaciona con el empleo del sistema de expresión génica proporcionado por esta invención para la producción y obtención de QVLPs de la invención.

25 Las QVLPs de la invención pueden ser utilizadas como vectores o vehiculizadores de productos de interés, tales como moléculas con actividad biológica, por ejemplo, fármacos, polipéptidos, proteínas, ácidos nucleicos, etc., por lo que pueden ser utilizadas con fines terapéuticos, de diagnóstico o de investigación. En una realización particular, dichas moléculas de interés biológico incluyen polipéptidos de interés, tales como 30 antígenos o inductores de respuestas inmune en animales o humanos a los que se suministre, o bien incluyen secuencias de ácido nucleico, útiles en terapia génica, destinadas a ser introducidas en el interior de las células apropiadas.

Por tanto, en otro aspecto, la invención se relaciona con el empleo de las QVLPs de la invención en la elaboración de medicamentos, por ejemplo, vacunas, vectores para terapia génica (delivery systems), etc. En una realización particular, dicho medicamento es una vacuna destinada a conferir protección frente a enfermedades humanas o animales causadas por virus, bacterias, parásitos o cualquier otro tipo de microorganismos, o frente a enfermedades tumorales. En otra realización particular, dicho medicamento es un vector para terapia génica.

En otro aspecto, la invención proporciona una vacuna que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de QVLPs de la invención, junto con, opcionalmente, uno o más adyuvantes y/o vehículos farmacéuticamente aceptables. Dicha vacuna es útil para proteger animales y humanos frente a enfermedades causadas por microorganismos (virus, bacterias, parásitos, etc.), o frente a enfermedades tumorales. En una realización particular, dicha vacuna resulta especialmente útil para proteger animales y humanos simultáneamente frente a la infección causada por dos o más agentes infecciosos causantes de enfermedades. A modo ilustrativo, la vacuna proporcionada por esta invención puede ser utilizada para proteger aves, por ejemplo, pollos, pavos, ocas, gansos, faisanes, codornices, avestruces, etc., frente al virus causante de la bursitis infecciosa (IBDV) y frente a uno o más agentes infecciosos responsables de enfermedades aviares (patógenos aviares).

En el sentido utilizado en esta descripción, la expresión "cantidad terapéuticamente efectiva" se refiere a la cantidad de QVLPs de la invención calculada para producir el efecto deseado y, en general, vendrá determinada, entre otras causas, por las características propias de las QVLPs y el efecto de inmunización a conseguir.

Los adyuvantes y vehículos farmacéuticamente aceptables que pueden ser utilizados en dichas vacunas son los adyuvantes y vehículos conocidos por los técnicos en la materia y utilizados habitualmente en la elaboración de vacunas.

En una realización particular, dicha vacuna se prepara en forma de una solución o suspensión acuosa, en un diluyente farmacéuticamente aceptable, tal como solución salina, solución salina tamponada con fosfato (PBS), o cualquier otro diluyente farmacéuticamente aceptable.

La vacuna proporcionada por esta invención puede ser administrada por cualquier vía de administración apropiada que dé como resultado una respuesta inmune protectora frente a la secuencia heteróloga o epítopo utilizado, para lo cual dicha vacuna se formulará

en la forma farmacéutica adecuada a la vía de administración elegida. En una realización particular, la administración de la vacuna proporcionada por esta invención se efectúa por vía parenteral, por ejemplo, por vía intraperitoneal, subcutánea, etc.

Los siguientes ejemplos ilustran la invención y no deben ser considerados en 5 sentido limitativo de la misma.

EJEMPLO 1

Obtención de QVLPs de IBDV en células de insecto

1.1 Obtención de QVLPs de IBDV, VP2-his-VP3, mediante dos rBVs independientes

10 en células de insecto

En este ejemplo se describen los resultados de una serie de experimentos diseñados para analizar la posibilidad de obtener QVLPs de IBDV a partir de la coexpresión de las proteínas pVP2 y VP3 de IBDV y un péptido heterólogo a partir de dos genes quiméricos independientes. Para ello, se han utilizado dos baculovirus recombinantes (rBVs) descritos 15 previamente, FB/his-VP3 (Kochan, G., González, D. & Rodríguez, J. F. (2003). Characterization of the RNA binding activity of VP3, a major structural protein of IBDV. *Archives of Virology* 148, 723-744) y FB/VPX, aquí citado como FB/pVP2, (Martínez-Torrecuadrada, J. L., Castón, J. R., Castro, M., Carrascosa, J. L., Rodríguez, J. F. & Casal, J. I. (2000). Different architectures in the assembly of infectious bursal disease virus 20 capsid proteins expressed in insect cells. *Virology* 278, 322-331). Estos rBVs fueron generados mediante el clonaje en vectores apropiados de los DNA complementarios (cDNAs) codificadores de las proteínas pVP2 y pVP3 de IBDV. Dichos cDNAs fueron obtenidos por RT-PCR a partir del segmento A del genoma de IBDV serotipo I cepa 25 Soroa (número de acceso al NCBI, AAD30136). El rBV FB/his-VP3 expresa una proteína VP3 quimérica que en su extremo N-terminal contiene un tandem de 6 histidinas fusionadas a la secuencia de VP3 (Met754-Glu1012 de la poliproteína) denominada his-VP3. El rBV FB/pVP2 expresa la región codificadora de la proteína pVP2 (Met1-Ala512).

El análisis de la expresión de estas proteínas pVP2 y his-pVP3, bien de forma independiente o conjunta, se realizó en cultivos celulares. Para la realización de estos 30 experimentos, se utilizaron cultivos en monocapa de células procedentes del insecto *Trichoplusia ni* (H5, Invitrogen) que fueron crecidos sobre cubreobjetos de cristal. Dichos cultivos fueron infectados independientemente con FB/pVP2, FB/his-VP3, o co-infectados con ambos rBVs. La multiplicidad de infección fue de 5 ufp/célula. A las 48

horas después de la infección (hpi) las células fueron fijadas, e incubadas con sueros policlonales de conejo anti-VP2 y policlonales de rata anti-VP3 (Fernández-Arias, A., Risco, C., Martínez, S., Albar, J. P. & Rodríguez, J. F. (1998). Expression of ORF A1 of infectious bursal disease virus infectious bursal disease virus results in the formation of virus-like particles. *Journal of General Virology* 79, 1047-1054). Después de sucesivos lavados, los cubreobjetos fueron incubados con sueros de cabra anti-rata conjugado con Alexa 594 y de cabra anti-conejo conjugado a Alexa 488 (Jackson Immunoresearch Laboratories, Inc.). Los núcleos celulares fueron teñidos con el marcador específico To-Pro-3 (Molecular Probes, Inc.). Finalmente, las muestras se visualizaron por epifluorescencia con un microscopio Zeiss Axiovert 200 equipado con el sistema confocal Bio Rad Radiance 2100. Las imágenes obtenidas se almacenaron utilizando el equipo de software Laser Sharp Package (Bio Rad). Como se muestra en la Figura 2a, en los cultivos infectados con FB/pVP2 el suero anti-VP2 mostró una señal granular fina mezclada con estructuras tubulares ambas distribuidas en todo el citoplasma. La señal anti-VP3, 15 detectada en las células infectadas con el rBV FB/his-VP3, se caracterizó por la presencia de acumulaciones de forma esférica alrededor del núcleo y aparentemente huecas. En los cultivos coinfectados con ambos virus recombinantes se detectó una notable modificación en el patrón de distribución de ambas proteínas. En estas células, las señales específicas de pVP2 y VP3 se colocalizaron en acumulaciones esféricas y densas, sugiriendo que su 20 coexpresión permitía la formación de complejos pVP2/his-VP3 (Figura 2c a la 2e).

Con la intención de caracterizar estas estructuras en mayor detalle, extractos similares, correspondientes a células infectadas con FB/pVP2+FB/hisVP3 fueron analizados por microscopía electrónica de transmisión (TEM). Como control, y en paralelo, se analizaron por la misma técnica cultivos de células H5 infectadas con la cepa 25 silvestre del virus FBD (FastBacDual, Invitrogen). Después de la infección, las células fueron recogidas a las 48 h, y procesadas como se ha descrito previamente (Fernández-Arias, A., Risco, C., Martínez, S., Albar, J. P. & Rodríguez, J. F. (1998). Expression of ORF A1 of infectious bursal disease virus infectious bursal disease virus results in the formation of virus-like particles. *Journal of General Virology* 79: 1047-1054) para su 30 análisis en cortes ultrafinos por TEM. Como se muestra en la Figura 2, el citoplasma de las células coinfectadas contiene agregados formados por una mezcla de túbulos y estructuras similares a cápsidas (Figura 2g, 2h y 2i). Estos agregados no fueron observados en ningún caso en las muestras correspondientes a células infectadas con el

virus silvestre FBD (Figura 2f). El aspecto y el tamaño de los túbulos, así como de las estructuras similares a cápsidas fue semejante a los descritos previamente en cultivos celulares infectados con VT7/Poly, un recombinante del virus vaccinia que expresa el gen de la poliproteína de IBDV (Fernández-Arias, A., Risco, C., Martínez, S., Albar, J. P. & 5 Rodríguez, J. F. (1998). Expression of ORF A1 of infectious bursal disease virus infectious bursal disease virus results in the formation of virus-like particles. *Journal of General Virology* 79: 1047-1054).

Para establecer de forma inequívoca que la coexpresión de pVP2 y his-VP3 permitía el ensamblaje y, por tanto, la obtención de QVLPs, se decidió purificar las 10 partículas formadas. Para ello, se infectaron con FB/pVP2+FB/his-VP3 cultivos de células H5. 60 hpi, las células se homogeneizaron y los extractos se separaron en gradientes de sacarosa tal y como se ha descrito previamente (Lombardo, E., Maraver, A., Castón, J. R., Rivera, J., Fernández-Arias, A., Serrano, A., Carrascosa, J. L. & Rodríguez, J. F. (1999). VP1, the putative RNA-dependent RNA polymerase of infectious bursal disease virus, 15 forms complexes with the capsid protein VP3, leading to efficient encapsidation into virus-like particles. *Journal of Virology* 73, 6973-6983). Después de su centrifugación, los gradientes fueron fraccionados, y las distintas fracciones fueron analizadas por TEM como se ha descrito previamente (Lombardo, E., Maraver, A., Castón, J. R., Rivera, J., Fernández-Arias, A., Serrano, A., Carrascosa, J. L. & Rodríguez, J. F. (1999). VP1, the 20 putative RNA-dependent RNA polymerase of infectious bursal disease virus, forms complexes with the capsid protein VP3, leading to efficient encapsidation into virus-like particles. *Journal of Virology* 73, 6973-6983). Como control, y sujetos al mismo procedimiento, se fraccionaron gradientes correspondientes a extractos de células infectadas con el rBV FB/VPX o con el rBV FBD/Poly-VP1. El virus recombinante 25 FBD/Poly-VP1 expresa simultáneamente la poliproteína y el polipéptido VP1. Como era predecible, la infección con FBD/Poly-VP1 tenía como resultado una eficiente producción de VLPs (Maraver, A., Oña, A., Abaitua, F., González, D., Clemente, R., Diaz-Ruiz, A., Caston, J. R., Pazos, F. & Rodríguez, J. F. (2003). The oligomerization domain of VP3, the scaffolding protein of infectious bursal disease virus, plays a critical role for capsid 30 formation. *Journal of Virology* 77:6438-49). Por otra parte, las fracciones correspondientes a las células infectadas con FB/VPX sólamente contenían túbulos de aspecto retorcido. Los gradientes correspondientes a células coinfectadas con los rBVs FB/pVP2+FB/his-VP3 contenían túbulos rígidos de tipo I en las fracciones cercanas al

fondo del gradiente, y QVLPs en las centrales y en las fracciones superiores (Figura 3b). Las QVLPs aisladas de las células co-infectadas con rBV FB/pVP2+FB/his-VP3 tenían un diámetro de 65-70 nm, así como un contorno poligonal característico, absolutamente indistinguible de las VLPs purificadas de cultivos infectados con FBD/Poly-VP1

5 (Maraver, A., Oña, A., Abaitua, F., González, D., Clemente, R., Diaz-Ruiz, A., Caston, J. R., Pazos, F. & Rodríguez, J. F. (2003). The oligomerization domain of VP3, the scaffolding protein of infectious bursal disease virus, plays a critical role for capsid formation. *Journal of Virology* 77:6438-49) o de los cultivos infectados con VT7/Poly (Fernández-Arias, A., Risco, C., Martínez, S., Albar, J. P. & Rodríguez, J. F. (1998).

10 Expression of ORF A1 of infectious bursal disease virus infectious bursal disease virus results in the formation of virus-like particles. *Journal of General Virology* 79, 1047-1054).

Con la intención de conseguir una caracterización bioquímica del material obtenido, se realizaron experimentos de western-blot en los que las distintas fracciones se enfrentaron a sueros específicos contra las proteínas VP1, pVP2, VP3 y VP4 (Fernández-Arias *et al.* 1998, citado *supra*; Lombardo *et al.*, 1999). Como control se utilizaron extractos de células infectadas con IBDV. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 3d. Como se esperaba, las bandas correspondientes a los polipéptidos VP1 y VP4 sólo fueron detectadas en muestras correspondientes a células infectadas con FBD/Poly-VP1. Los patrones correspondientes a pVP2/VP3 en muestras correspondientes a células infectadas con FBD/Poly-VP1 o coinfectadas con FB/VPX+ FB/his-VP3 fueron similares, detectándose dos bandas correspondientes a pVP2 y VP3, respectivamente.

1.2 Obtención de QVLPs de IBDV, pVP2-his-VP3, mediante un único rBV en células de insecto

Además, se procedió a la construcción del plásmido pFBD/pVP2-his-VP3. El primer paso de la construcción se realizó mediante el clonaje de la región codificante de la proteína pVP2 en el vector pFBD (Invitrogen). El fragmento de DNA correspondiente a pVP2 se obtuvo mediante PCR con los oligonucleótidos identificados como Oligo I (SEQ ID NO: 1) y Oligo II (SEQ ID NO: 2) empleando como molde el plásmido pVOTE.2/Poly (Fernández-Arias, A., Risco, C., Martínez, S., Albar, J. P. & Rodríguez, J. F. (1998). Expression of ORF A1 of infectious bursal disease virus infectious bursal disease virus results in the formation of virus-like particles. *Journal of General Virology*

79, 1047-1054). El fragmento fue purificado, sometido a digestión con los enzimas *Bgl*II y *Hind*III y clonado en el vector pFBDual (Invitrogen) previamente digerido con los enzimas *Bam*HI y *Hind*III. El plásmido resultante se denominó pFBD/pVP2. A continuación, se obtuvo un fragmento de DNA conteniendo la fase de lectura abierta 5 correspondiente a la proteína VP3 mediante digestión del plásmido pFB/his-VP3 (Kochan et al., 2003, citado *supra*) con el enzima *Rsr*II, tratamiento con Klenow, y posterior restricción con *Kpn*I. Este fragmento de DNA fue purificado y clonado en el plásmido pFBD/pVP2 previamente digerido con los enzimas *Sma*I y *Kpn*I. El plásmido resultante 10 se denominó pFBD/pVP2-his-VP3 (SEQ ID NO: 3) y contiene la secuencia de nucleótidos codificante de las proteínas pVP2 y de la proteína de fusión his-VP3 que contiene una secuencia heteróloga de 6 his (esta última está codificada por la cadena complementaria a los nucleótidos 6734-7585 de la SEQ ID NO: 3). La secuencia de aminoácidos de la proteína pVP2 y de la proteína de fusión his-VP3 (pVP2-his-VP3) 15 codificada por la secuencia de nucleótidos contenida en dicho plásmido pFBD/pVP2-his-VP3 se muestra en la SEQ ID NO: 4.

El plásmido pFBD/pVP2-his-VP3 permitió la obtención de un rBV, denominado FBD/pVP2-his-VP3, que expresa durante su ciclo de replicación ambas proteínas simultáneamente [<http://invitrogen.com/content/sfs/manuals/bevtest.pdf>].

Los resultados obtenidos con FBD/pVP2-his-VP3 en células de insecto son 20 idénticos a los obtenidos mediante la coinfección con los rBVs FB/pVP2 y FD/his-VP3, obteniéndose QVLPs de IBDV con el péptido heterólogo de seis histidinas (6his).

EJEMPLO 2

Obtención de QVLPs de IBDV, pVP2-VP3-GFP, en levaduras

Con el fin de estudiar la posibilidad de obtener QVLPs de IBDV en cultivos de 25 levadura (*Saccharomyces cerevisiae*) se generó el vector pESCURA/pVP2-VP3-GFP con el gen heterólogo GFP unido al extremo N-terminal de VP3. El primer paso en la construcción del vector se realizó mediante el clonaje de la región codificante de la proteína pVP2 en el vector pESCURAinv. El plásmido pESCURAinv se generó mediante 30 digestión del vector pRS426 (Stratagene) con el enzima *Pvu*II y religación de la mezcla de digestión. El vector resultante, pESCURAinv, contiene la región de clonaje múltiple en posición invertida con respecto a la del vector parental pRS426. El fragmento de DNA correspondiente a la proteína pVP2 se obtuvo mediante PCR con los oligonucleótidos

identificados como Oligo III (SEQ ID NO: 5) y Oligo IV (SEQ ID NO: 6) empleando como molde el plásmido pVOTE.2/Poly (Fernández-Arias, A., Risco, C., Martínez, S., Albar, J. P. & Rodríguez, J. F. (1998). Expression of ORF A1 of infectious bursal disease virus infectious bursal disease virus results in the formation of virus-like particles. *Journal of General Virology* 79, 1047-1054). El fragmento fue purificado, sometido a digestión con los enzimas BglII y HindIII y clonado en el vector pESCURA.inv previamente digerido con los enzimas BamHI y HindIII. El plásmido resultante se denominó pESCURA/pVP2.

El plásmido pFB/VP3-GFP fue construido en dos etapas. La primera consistió en el clonaje de una fragmento de DNA, generado mediante PCR, que contiene la ORF de la proteína VP3 carente del codón de terminación. Este PCR se realizó utilizando los oligonucleótidos identificados como Oligo V (SEQ ID NO: 9) y Oligo VI (SEQ ID NO: 10) y empleando como molde el plásmido pVOTE.2/Poly (Fernández-Arias, A., Risco, C., Martínez, S., Albar, J. P. & Rodríguez, J. F. (1998). Expression of ORF A1 of infectious bursal disease virus results in the formation of virus-like particles. *Journal of General Virology* 79, 1047-1054). El DNA resultante fue digerido con los enzimas EcoRI y BamHI y clonado en el vector pEGFP-N3 (Clontech) también digerido con los mismos enzimas. El plásmido resultante se denominó pVP3-GFP. A continuación, el plásmido pEGFP-GFP fue digerido con los enzimas EcoRI y NotI y clonado en el vector pFastBac1 (Invitrogen). El plásmido resultante se denominó pFB/VP3-GFP.

Seguidamente, se obtuvo un fragmento de DNA que contenía la fase de lectura abierta correspondiente a la proteína VP3 fusionada a la región codificante de la proteína EGFP mediante digestión del plásmido pFB/VP3-GFP con los enzimas EcoRI y NotI. Este fragmento de DNA fue purificado y clonado en el plásmido pESCURA/pVP2 previamente digerido con los enzimas EcoRI y NotI. El plásmido resultante se denominó pESCURA/pVP2-VP3-GFP (SEQ ID NO: 7) y contiene las ORFs de la proteína pVP2 y VP3-GFP bajo el control transcripcional de dos promotores independientes, GAL 1 y GAL 10, ambos inducibles por galactosa (la proteína pVP2 está codificada por la cadena nucleótidos complementaria a los nucleótidos 5862-7343 de la SEQ ID NO: 7). La secuencia de aminoácidos de la proteína pVP2 y de la proteína de fusión VP3-GFP (pVP2-VP3-GFP) codificada por la secuencia de nucleótidos contenida en dicho plásmido pESCURA/pVP2-VP3-GFP se muestra en la SEQ ID NO: 8.

Posteriormente, pESCURA/pVP2-VP3-GFP se empleó para transformar un cultivo

de la levadura *S. cerevisiae* haploide cepa 499 según un protocolo previamente descrito (Gietz, R.D. and R.A. Woods. (2002) Transformation of yeast by the Liac/SS carrier DNA/PEG method. Methods in Enzymology 350: 87-96). Las levaduras transformadas con el plásmido fueron seleccionadas mediante crecimiento en placas de medio SC (CSM + YNB, glucosa 2% y bacto agar) suplementadas con los aminoácidos triptófano, leucina e histidina y carentes de uracilo (-Ura). Tras una incubación de 48 h a 30°C, se seleccionó una colonia que fue empleada para la realización de los subsiguientes análisis de expresión de proteínas y formación de QVLPs.

El análisis de la expresión de las proteínas pVP2 y VP3 y formación de QVLPs se realizó siguiendo un protocolo descrito previamente para la caracterización de VLPs de IBDV en otros sistemas de expresión (Fernández-Arias, A., Risco, C., Martínez, S., Albar, J. P. & Rodríguez, J. F. (1998). Expression of ORF A1 of infectious bursal disease virus results in the formation of virus-like particles. *Journal of General Virology* 79, 1047-1054; Lombardo, E., Maraver, A., Castón, J. R., Rivera, J., Fernández-Arias, A., Serrano, A., Carrascosa, J. L. & Rodríguez, J. F. (1999). VP1, the putative RNA-dependent RNA polymerase of infectious bursal disease virus, forms complexes with the capsid protein VP3, leading to efficient encapsidation into virus-like particles. *Journal of Virology* 73, 6973-698). La colonia seleccionada fue cultivada en medio liquido CSM (-Ura) + YNB suplementado con rafinosa al 2%. El cultivo se incubó a 30°C durante 24 h. Este cultivo fue empleado para inocular, a una densidad óptica (D.O.) de 0,2, un matraz de 200 ml de medio CSM (-Ura) + YNB suplementado con el inductor galactosa al 2%. El cultivo fue mantenido a 30°C durante 18 horas (hasta una D.O. entre 1,0 y 2,0). Las levaduras fueron centrifugadas a 3000 rpm, 5 min a 4°C, se lavaron con agua destilada 1 vez, y el pellet fue resuspendido en tampón de lisis (TEN: Tris 10 mM, pH 8,0; NaCl 150 mM; EDTA 1 mM) + inhibidores de proteasas 2X (Compl Roche). Para la lisis se añadió 1 volumen de "glass beads" (cuentas o perlas de vidrio) de un tamaño aproximado de 425-600 micrones (Sigma). Esta mezcla fue sometida al vortex vigoroso durante 30 segundos 4 veces, con intervalos de 30 segundos, y todo ello a 4°C. Tras ello se recuperó la fracción soluble por centrifugación de la mezcla de lisis a 13.000 rpm durante 15 min a 4°C. Esta muestra fue sometida a fraccionamiento en un gradiente de sacarosa de acuerdo al protocolo previamente descrito (Lombardo, E., Maraver, A., Castón, J. R., Rivera, J., Fernández-Arias, A., Serrano, A., Carrascosa, J. L. & Rodríguez, J. F. (1999). VP1, the putative RNA-dependent RNA polymerase of infectious bursal disease virus, forms complexes

with the capsid protein VP3, leading to efficient encapsidation into virus-like particles. *Journal of Virology* 73, 6973-6983). Las muestras obtenidas tras el fraccionamiento así como una muestra del material de partida fueron analizadas mediante electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE) [Current Protocols in Molecular Biology] e inmunodetección por Western blot (Figura 4A) empleando sueros anti-pVP2 y anti-VP3 [Current Protocols in Molecular Biology]. Como se muestra en la Figura 4A, el Western blot reveló la presencia de bandas, con la masa molecular predicha correspondiente a las proteínas pVP2 (48 kDa) y VP3-GFP (61 kDa), así como otras bandas inmunoreactivas de menor tamaño producidas probablemente por degradación proteolítica tanto en la muestra inicial como en las diferentes fracciones del gradiente. Estos resultados demostraron de forma fehaciente la correcta expresión de ambos polipéptidos en el cultivo de *S. cerevisiae* transformado con el plásmido pESCURA/pVP2-VP3. A continuación, las distintas fracciones del gradiente fueron analizadas mediante TEM como se ha descrito previamente (Lombardo, E., Maraver, A., 10 Castón, J. R., Rivera, J., Fernández-Arias, A., Serrano, A., Carrascosa, J. L. & Rodríguez, J. F. (1999). VP1, the putative RNA-dependent RNA polymerase of infectious bursal disease virus, forms complexes with the capsid protein VP3, leading to efficient encapsidation into virus-like particles. *Journal of Virology* 73, 6973-6983). Como se muestra en la Figura 4B, el análisis mediante TEM de las fracciones del gradiente reveló 15 la existencia de QVLPs de IBDV en las fracciones superiores del gradiente. Estas QVLPs presentan un diámetro de 65-70 nm y un contorno poligonal indistinguible de las VLPs de IBDV obtenidas en otros sistemas de expresión (Figura 4C).

EJEMPLO 3

25 Obtención y caracterización de la inmunogenicidad de QVLPs de IBDV

Como parte del desarrollo de nuevas estrategias de vacunación se analizó la posibilidad de emplear esta estrategia de producción de VLPs químicas (QVLPs) de IBDV que contuvieran secuencias aminoacídicas heterólogas, correspondientes a otras proteínas o péptidos implicados en la inducción de una respuesta inmune. Como modelo de estudio se abordó la posibilidad de obtener QVLPs que contuvieran, como polipéptido heterólogo que comprende un polipéptido de interés, la secuencia de aminoácidos correspondiente al epítopo CD8 (E-CD8) de la proteína CS de malaria (*Plasmodium yoelii*). Quantification of antigen specific CD8+ T cells using an ELISPOT assay. J 30

Immunol Methods 181: 45-54; Zavala, F., Rodrigues, M., Rodriguez, D., Rodriguez, J. R., Nussenzweig, R. S. and Esteban, M. (2001). A striking property of recombinant poxviruses: efficient inducers of in vivo expansion of primed CD8(+) T cells. Virology 280: 155-159). Este epítopo es responsable de la inducción de la respuesta inmune celular CD8-específica frente a este patógeno (Oliveira-Ferreira J, Miyahira Y, Layton GT, Savage N, Esteban M, Rodriguez D, Rodriguez JR, Nussenzweig RS, Zavala F, Myahira Y. (2000). Immunogenicity of Ty-VLP bearing a CD8(+) T cell epitope of the CS protein of *P. yoelii*: enhanced memory response by boosting with recombinant vaccinia virus. Vaccine 18: 1863-1869). Esta respuesta puede ser cuantificada mediante la técnica de ELISPOT (Miyahira Y, Murata K, Rodriguez D, Rodriguez JR, Esteban M, Rodrigues MM, Zavala F. (1995) Quantification of antigen specific CD8+ T cells using an ELISPOT assay. J Immunol Methods 181: 45-54) en cultivos de esplenocitos de ratones BALB/c.

Con este fin, se realizó la construcción del plásmido pFB/his-CD8-VP3. (SEQ ID NO: 13) siguiendo la estrategia de clonaje descrita más adelante. Este vector fue construido mediante inserción de un fragmento de DNA de 36 bp, generado mediante hibridación de los oligonucleótidos sintéticos identificados como CD8 A (SEQ ID NO: 11) y CD8 B (SEQ ID NO: 12), que contiene la secuencia codificadora del epítopo CD8 (SYVPSAEQI, ver los residuos 29 a 37 de las SEQ ID NO: 13 y 14) de la proteína CS de malaria en la ORF que codifica la proteína his-VP3 integrada en el vector pFB/his-VP3. El clonaje se realizó mediante ligación del fragmento de DNA generado mediante hibridación de los oligonucleótidos sintéticos CD8 A y B (SEQ ID NO: 11 y SEQ ID NO: 12) al plásmido pFB/his-VP3 digerido con el enzima de restricción EheI. Este plásmido pFB/his-CD8-VP3 (SEQ ID NO: 13) contiene una ORF que codifica una proteína de fusión denominada his-CD8-VP3 que contiene el epítopo CD8 insertado en el extremo correspondiente a la secuencia N-terminal de la ORF de proteína his-VP3. La secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión his-CD8-GFP codificada por la secuencia de nucleótidos contenida en dicho plásmido pFB/his-CD8-VP3 se muestra en la SEQ ID NO: 14.

El plásmido pFB/his-CD8-VP3 fue purificado y empleado para generar el correspondiente baculovirus recombinante (rBV), denominado FB/his-CD8-VP3, siguiendo la tecnología Bac-to-Bac de acuerdo con los protocolos descritos por el fabricante (Invitrogen BV, Groningen, The Netherlands).

3.1 Producción de QVLPs

Cultivos de células H5 fueron infectados simultáneamente con los baculovirus recombinantes FB/His-CD8-VP3 y FB/pVP2. El rBV FB/ pVP2 (véase el Ejemplo 1.1) expresa la región correspondiente a la proteína pVP2 (Met1-Ala 512) de la poliproteína de IBDV. A las 48 horas post-infección (pi) las células fueron recogidas y los extractos correspondientes sometidos al protocolo de purificación de VLPs de IBDV mediante fraccionamiento en gradientes lineales de sacarosa (Lombardo, E., Maraver, A., Castón, J. R., Rivera, J., Fernández-Arias, A., Serrano, A., Carrascosa, J. L. & Rodríguez, J. F. (1999). VP1, the putative RNA-dependent RNA polymerase of infectious bursal disease virus, forms complexes with the capsid protein VP3, leading to efficient encapsidation into virus-like particles. *Journal of Virology* 73: 6973-6983). Cada una de las fracciones obtenidas fue visualizada mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM) y analizada mediante SDS-PAGE e inmunoblot empleando un anticuerpo específico frente a VP3. Como se observa en la Figura 5A, la fracción 4 del gradiente contenía abundantes ensamblados con una estructura idéntica (perímetro poligonal y un diámetro de 65-70 nm) a las VLPs de IBDV obtenidas mediante expresión de la poliproteína viral. La caracterización bioquímica, mediante SDS-PAGE y Western blot (Figura 5B), demostró que estas QVLPs contienen una proteína, inmunoreactiva frente al suero anti-VP3, cuya masa molecular (33,5 kDa) es idéntica a la predicha para la proteína de fusión his-CD8-VP3 (33,591 kDa). Estos resultados permiten concluir que la co-expresión de los genes pVP2 e his-CD8-VP3 en células de insecto da lugar a la formación de VLPs químéricas (QVLPs) que contienen la proteína de fusión his-CD8-VP3. Estas QVLPs se denominaron QVLPs-CD8.

25

3.2 Análisis de la inmunogenicidad de las QVLPs-CD8

Con el fin de determinar la capacidad inmunogénica de las QVLPs-CD8 se realizaron dos ensayos idénticos empleando dos lotes de QVLPs-CD8 producidas y purificadas de forma independiente. Se emplearon 4 grupos (I, II, III y IV) de tres ratones hembra BalbC de ocho semanas de edad. Los grupos fueron formados al azar. La estrategia de inmunización fue similar a la empleada previamente en la caracterización de otros inmunógenos. Esta estrategia se basa en el empleo de una primera dosis (*priming*) de inmunización con el antígeno bajo estudio seguida por una segunda dosis de recuerdo (*booster*), que amplifica la respuesta primaria, con el virus vaccinia recombinante

VVpJRCS que expresa la proteína CS de malaria. La respuesta inmune inducida se determinó mediante la detección de las células T CD8⁺ específicas de antígeno, en función de su cualidad para producir IFN- γ , mediante un ensayo de ELISPOT (Miyahira Y, Murata K, Rodriguez D, Rodriguez JR, Esteban M, Rodrigues MM, Zavala F. (1995).

5 Quantification of antigen specific CD8+ T cells using an ELISPOT assay. J Immunol Methods 181: 45-54). En resumen, placas de 96 pocillos con fondos de nitrocelulosa (Millipore) se cubrieron con 75 μ l/pocillo de una solución que contenía 6 μ g/ml del anticuerpo monoclonal de rata anti-IFN- γ murino (R4-6A2, Pharmingen, San Diego, CA) resuspendido en PBS. Las placas fueron incubadas toda la noche a temperatura ambiente.

10 Posteriormente, se lavaron los pocillos tres veces con medio RPMI y, finalmente, se incubaron con medio RPMI suplementado con 10% suero fetal de ternera (FCS) durante una hora a 37°C en atmósfera de CO₂ al 5%. Por otro lado, los bazos de los ratones inmunizados, mantenidos en medio RPMI suplementado con 10% de FCS, se dispusieron en una rejilla estéril sobre una placa de 60 mm, y se homogeneizaron, disgregando el

15 extracto mediante su paso por agujas de diferente calibre (21G->25G). Las células así disgregadas se centrifugaron 5 min a 1.500 rpm a 4°C, y se lavaron dos veces con medio RPMI + 10% FCS. Para lisar los eritrocitos de las muestras, se añadió NH₄Cl 0,1 M estéril (2 ml/bazo) y se mantuvo a 4°C durante 3-5 min, se añadió RPMI + 10% FCS y se centrifugó. Después, se lavaron 2 veces, y finalmente se resuspendió en 1-2 ml RPMI +

20 10% FCS. El recuento de la viabilidad de los esplenocitos se realizó mediante tinción con azul tripan (4% en agua, Sigma).

Las células presentadoras profesionales (APC) utilizadas en este ensayo, fueron las P815. Estas células se ajustaron a una concentración de 10⁶ células/ml y se incubaron con el péptido sintético SYVPSAEQI (correspondiente a la región CD8 de la proteína CS de malaria) 10⁻⁶ M. Tras el tratamiento con el péptido, las células fueron lavadas y tratadas con mitomicina C (30 μ g/ml) (Sigma) durante 15 minutos a 37°C y en atmósfera de CO₂. Después de subsiguientes lavados, las células presentadoras, a las que se adicionó 30 U/ml de interleuquina 2 murina (IL-2), se añadieron a una concentración de 10⁵ células/pocillo. Asimismo, se añadió 100 μ l/pocillo de 10⁶ esplenocitos/ml y diluciones 1/4 y 1/16. Las placas se incubaron durante 18 horas a 37°C en atmósfera de CO₂, se lavaron 5 veces con PBST y se incubaron con 2 μ g/ml del anticuerpo monoclonal de rata biotinilado anti-IFN- γ XMG1.2 (Pharmingen) diluido en PBST, durante 2 horas a temperatura ambiente. Después se lavaron las placas 5 veces con PBST y se añadió una dilución 1/800 de

avidina-peroxidasa (0,5 mg/ml) (Sigma). Tras 1 hora de incubación a temperatura ambiente, se lavó 3 veces con PBST y 2 con PBS, añadiéndose finalmente la mezcla reveladora con 1 µg/ml del sustrato DAB (Sigma), resuspendido en Tris-HCl, pH 7.5, 50 mM, conteniendo 0,015% de H₂O₂. La reacción se detuvo lavando la placa con abundante agua, y una vez seca se llevó a cabo el recuento de las marcas de deposición (spots) con la ayuda de un estereomicroscopio de Leica MZ122 APO y el software Imaging System QWIN (Leica, Cambridge, United kingdom).

Las inmunizaciones fueron realizadas de acuerdo al programa de inmunización descrito en la siguiente tabla:

10

Grupo	1 ^a Inmunización. Día 0	2 ^a Inmunización. Día 14
I	No inmunizado	VVpJRPyCS
II	VVpJRPyCS	VVpJRPyCS
III	VLPs IBDV	VVpJRPyCS
IV	QVLPs-CD8	VVpJRPyCS

Las inmunizaciones con VVpJRCS se realizaron por vía intraperitoneal empleando 10⁷ unidades formadoras de placa (ufp) por animal. Las inmunizaciones con VLPs, tanto VLPs de IBDV no químéricas como QVLPs-CD8, fueron realizadas por vía intraperitoneal con una dosis de 50 µg de antígeno por animal. En todos los casos las preparaciones antigenicas fueron diluidas en tampón fosfato salino (PBS).

28 días después de la primera inmunización los animales fueron sacrificados y sus bazo empleados para la realización de los ensayos de ELISPOT. Estos ensayos se realizaron siguiendo el protocolo descrito anteriormente. En ambos ensayos se obtuvieron resultados prácticamente idénticos. La Figura 6 muestra los resultados correspondientes al primer ensayo. Los resultados obtenidos demuestran que cuando se emplean QVLPs-CD8 como primera dosis de inmunización seguida por una dosis de recuerdo con el virus VVpJRCS (grupo IV) se produce una potente estimulación de la respuesta inmune celular específica frente al epítopo CD8 de malaria. Esta estimulación es muy superior (20 veces aproximadamente) a la obtenida tras la inmunización con una (grupo I) ó dos dosis de VVpJRCS (grupo II). El hecho de que no se produzca una estimulación significativa de la respuesta frente a E-CD8 en animales inmunizados con VLPs no químéricas de IBDV (grupo III), respecto al grupo I, que recibió una única dosis de VVpJRCS, demuestra que

la respuesta obtenida en el grupo IV es inducida específicamente por el E-CD8 presente en las proteína de fusión his-CD8-VP3 que forma parte integral de las QVLPs-CD8.

REIVINDICACIONES

1. Una cápsida vacía químérica del virus causante de la enfermedad de la bursitis infecciosa (IBDV), caracterizada porque está constituida por ensamblaje de (i) proteínas pVP2 de IBDV y (ii) proteínas de fusión que comprenden una región A constituida por la proteína VP3 de IBDV unida a una región B constituida por un polipéptido heterólogo que comprende un polipéptido de interés.
5
2. Cápsida según la reivindicación 1, en la que dicha región B está unida a la región amino-terminal de la VP3 de IBDV, o, alternativamente, a la región carboxi-terminal de VP3 IBDV.
10
3. Cápsida según la reivindicación 1, en la que dicho polipéptido de interés es un polipéptido útil en vacunación, terapia o diagnóstico.
15
4. Cápsida según la reivindicación 1, en la que dicha región B comprende un único polipéptido de interés.
5. Cápsida según la reivindicación 1, en la que dicha región B comprende dos o más polipéptidos de interés.
20
6. Cápsida según la reivindicación 1, en la que dicha proteína de fusión comprende una región A unida a una única región B.
25
7. Cápsida según la reivindicación 1, en la que dicha proteína de fusión comprende una región A unida a dos regiones B, iguales o diferentes, una de ellas unida a la región amino-terminal de la VP3 presente en la región A y la otra a la región carboxi-terminal de VP3 presente en la región A.
- 30
8. Cápsida según la reivindicación 7, en la que dichas regiones B contienen unos polipéptidos de interés iguales o diferentes entre sí.

9. Cápsida según la reivindicación 1, en la que dicha proteína de fusión comprende, además, un polipéptido espaciador situado entre dichas regiones A y B.

10. Un ácido nucleico caracterizado porque su secuencia de nucleótidos 5 comprende la secuencia de nucléótidos que codifica para la proteína de fusión definida en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9.

11. Un ácido nucleico caracterizado porque su secuencia de nucleótidos comprende (i) una secuencia de nucléótidos que comprende la fase de lectura abierta 10 correspondiente a la proteína VP3 de IBDV y (ii) una secuencia de nucleótidos que comprende la fase de lectura abierta de uno o más polipéptidos heterólogos que comprenden uno o más polipéptidos de interés.

12. Ácido nucleico según la reivindicación 11, que comprende, además, (iii) una 15 secuencia de nucléótidos que comprende la fase de lectura abierta correspondiente a la proteína pVP2 de IBDV.

13. Una construcción génica que comprende un ácido nucleico según la reivindicación 10 ú 11.

20 14. Una construcción génica que comprende un ácido nucleico según la reivindicación 12.

15. Un sistema de expresión seleccionado entre:

25 a) un sistema de expresión que comprende una primera construcción génica según la reivindicación 13, operativamente unida a unos elementos de control de transcripción y, opcionalmente, de traducción, y una segunda construcción génica, operativamente unida a unos elementos de control de transcripción y, opcionalmente, de traducción, comprendiendo dicha segunda construcción génica una secuencia de nucléótidos que comprende la fase de lectura abierta correspondiente a la proteína pVP2 de IBDV; y 30

b) un sistema de expresión que comprende una construcción génica según la reivindicación 14, operativamente unida a unos elementos de control de transcripción y, opcionalmente, de traducción.

16. Sistema de expresión según la reivindicación 15, caracterizado porque dicho sistema se selecciona entre plásmidos, bácmidos, cromosomas artificiales de levadura (YACs), cromosomas artificiales de bacteria (BACs), cromosomas artificiales basados en el bacteriófago P1 (PACs), cósmidos, o virus, que pueden contener, opcionalmente, un 5 origen de replicación heterólogo.

17. Una célula huésped que contiene un ácido nucleico según cualquiera de las reivindicaciones 10 a 12, o una construcción génica según cualquiera de las reivindicaciones 13 ó 14, o un sistema de expresión según cualquiera de las 10 reivindicaciones 15 ó 16.

18. Una célula huésped transformada, transfectada o infectada con un sistema de expresión según cualquiera de las reivindicaciones 15 ó 16.

15 19. Célula huésped según la reivindicación 17 ó 18, caracterizada porque se selecciona entre una célula de mamífero, una célula aviar, una célula de insecto y una levadura.

20 20. Un procedimiento para la producción de cápsidas vacías quiméricas del virus causante de la enfermedad de la bursitis infecciosa (IBDV) según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, que comprende cultivar una célula huésped según cualquiera de las reivindicaciones 17 a 19, y, si se desea, recuperar dichas cápsidas vacías quiméricas de IBDV.

25 21. Procedimiento según la reivindicación 20, en el que dicha célula huésped es una célula de insecto, que comprende las etapas de:

30 a) preparar un sistema de expresión seleccionado entre (I) y (II), en donde:
- el sistema de expresión (I) está constituido por un baculovirus recombinante que contiene una construcción génica según la reivindicación 14; y
- el sistema de expresión (II) está constituido por un primer baculovirus recombinante que contiene una construcción génica que codifica para la

proteína pVP2 de IBDV y por un segundo baculovirus recombinante que contiene una construcción génica según la reivindicación 13;

- 5 b) infectar células de insecto con dicho sistema de expresión preparado en la etapa a);
- c) cultivar las células de insecto infectadas obtenidas en la etapa b) bajo condiciones que permiten la expresión de las proteínas recombinantes y su ensamblaje para formar cápsidas vacías químéricas de IBDV; y
- d) si se desea, aislar y, opcionalmente, purificar, las cápsidas vacías químéricas de IBDV.

10

22. Procedimiento según la reivindicación 20, en el que dicha célula huésped es una levadura, que comprende las etapas de:

- 15 a) preparar un sistema de expresión constituido por un plásmido que contiene una construcción génica según la reivindicación 14;
- b) transformar células de levadura con dicho sistema de expresión preparado en la etapa a);
- c) cultivar las levaduras transformadas obtenidas en la etapa b) bajo condiciones que permiten la expresión de las proteínas recombinantes y su ensamblaje para formar cápsidas vacías químéricas de IBDV; y
- 20 d) si se desea, aislar y, opcionalmente, purificar, las cápsidas vacías químéricas de IBDV.

25 23. Empleo de un sistema de expresión génica según cualquiera de las reivindicaciones 15 ó 16, para la producción y obtención de cápsidas vacías químéricas de IBDV según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9.

24. Empleo de cápsidas vacías químéricas del virus causante de la enfermedad de la bursitis infecciosa (IBDV) según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en la elaboración de un medicamento.

30

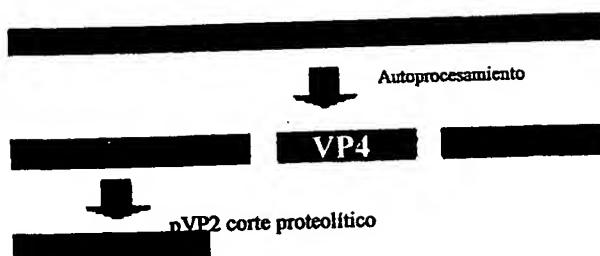
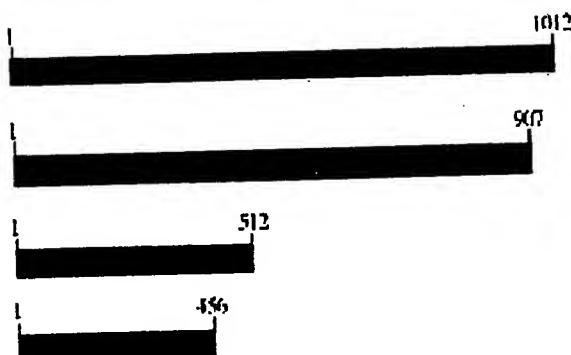
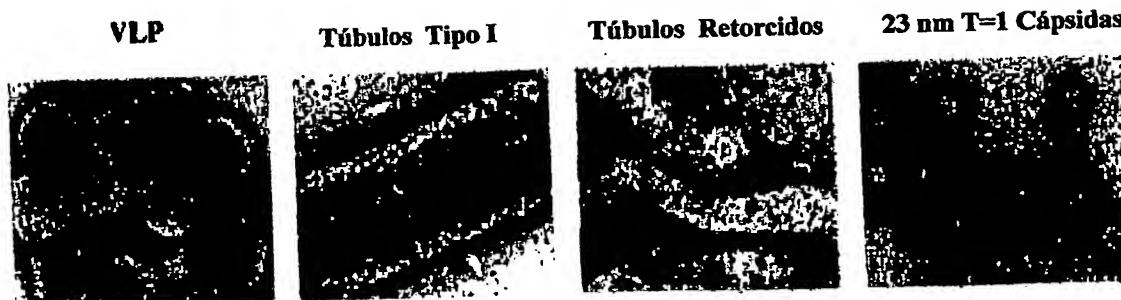
25. Empleo según la reivindicación 24, en el que dicho medicamento es una vacuna.

26. Empleo según la reivindicación 24, en el que dicho medicamento es un vector para terapia génica.

27. Una vacuna que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de cápsidas vacías químéricas del virus causante de la enfermedad de la bursitis infecciosa (IBDV) según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, junto con, opcionalmente, uno o más adyuvantes y/o vehículos farmacéuticamente aceptables.

28. Vacuna según la reivindicación 27, útil para proteger animales y humanos simultáneamente frente a la infección causada por dos o más agentes infecciosos causantes de enfermedades.

29. Un vector para terapia génica que comprende una cápsida vacía químérica del virus causante de la enfermedad de la bursitis infecciosa (IBDV) según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9.

a*b***Construcción Génica****Estructura Resultante****Figura 1**

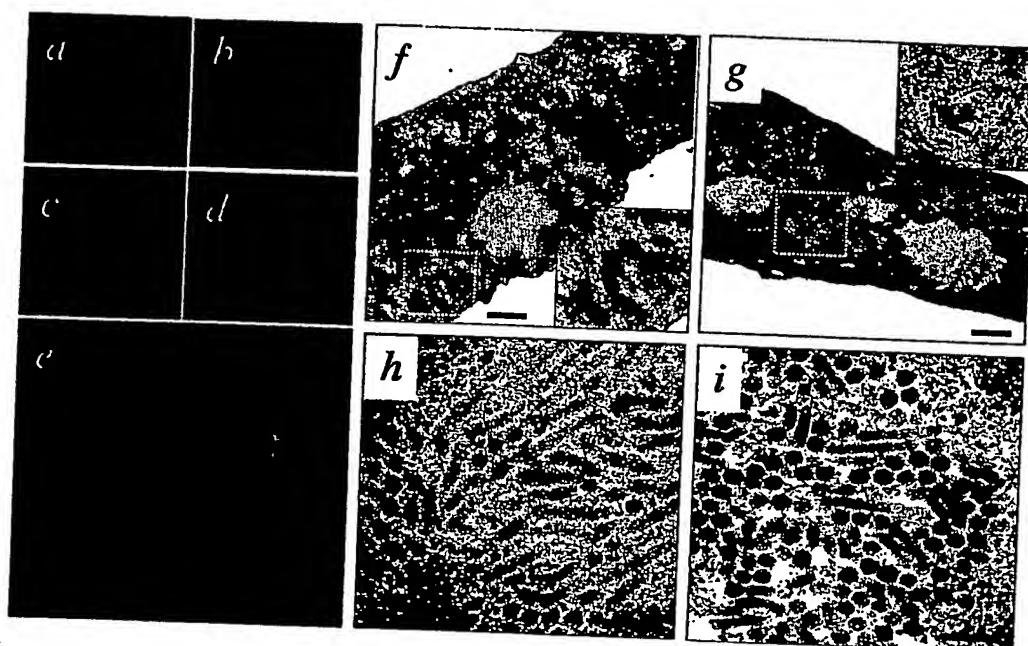


Figura 2

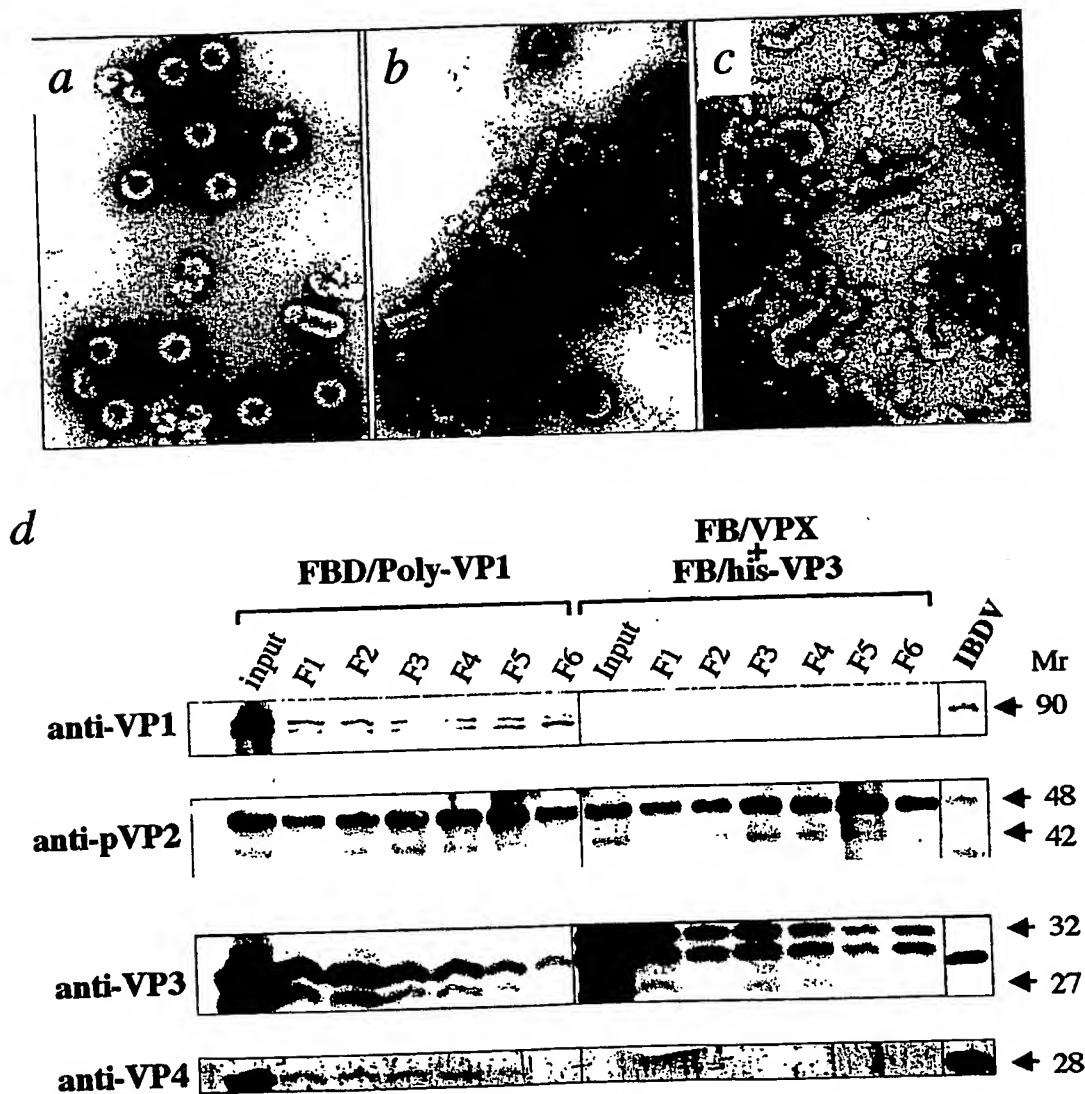
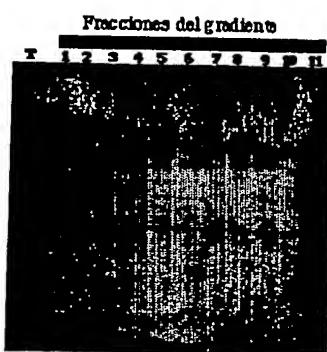


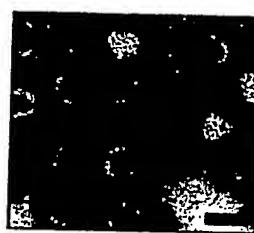
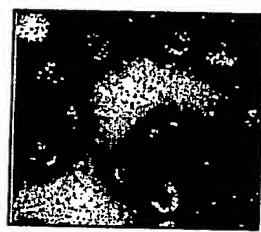
Figura 3

A

Anti-VP3



Anti-pVP2

B**C****Figura 4**

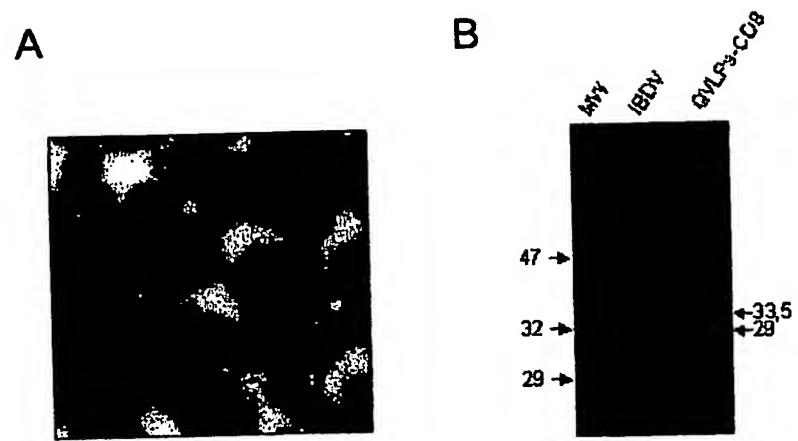


Figura 5

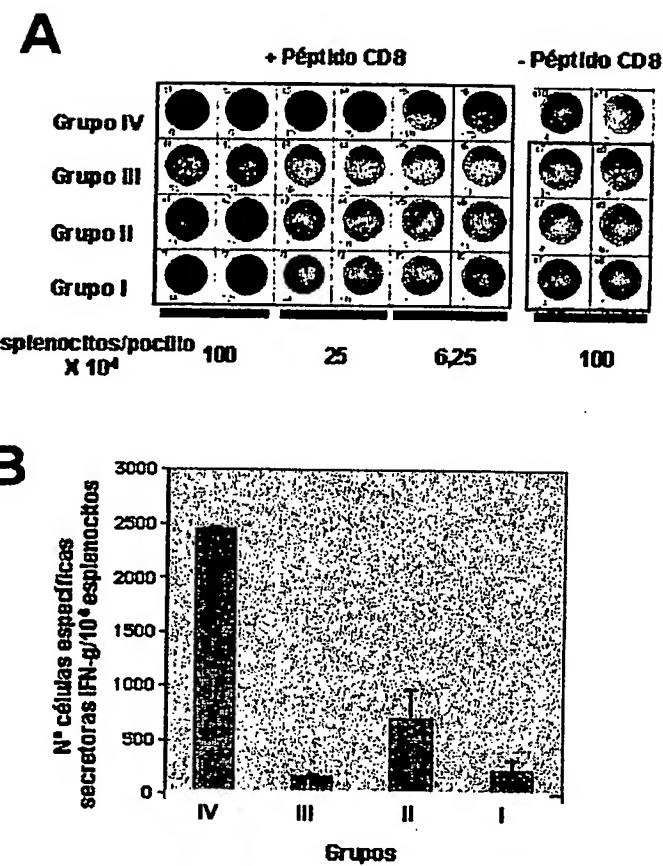


Figura 6

LISTA DE SECUENCIAS

<110> CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTIFICAS
 5 <110> BIONOSTRA, S.L.
 <120> CÁPSIDAS VACÍAS QUIMÉRICAS DEL VIRUS CAUSANTE DE LA
 ENFERMEDAD DE LA BURSITIS INFECCIOSA (IBDV), SU PROCEDIMIENTO DE
 OBTENCIÓN Y APLICACIONES
 10 <130> QVLPs de IBDV
 <160> 14
 15 <170> PatentIn version 3.1

<210> 1
 <211> 35
 20 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Oligo I
 25 <400> 1
 gcgcagatct atgacaaacc tgtcagatca aaccc 35

30 <210> 2
 <211> 34
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> Oligo II
 <400> 2
 gcgcaagctt aggcgagagt cagctgcctt atgc 34

40 <210> 3
 <211> 7595
 <212> DNA
 45 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Plásmido pFBD/pVP2-his-VP3

50 <220>
 <221> promotor
 <222> (157)..(285)
 <223> Promotor ppolh

55 <220>
 <221> CDS
 <222> (291)..(1289)
 <223> pVP2 ORF

```

<220>
<221> promotore
<222> (7443)..(7503)
<223> Promotor p10

5 <400> 3
gggtgatcaa gtcttcgtcg agtgattgta aataaaaatgt aatttacagt atagtat 60
10 aattaatata caaatgattt gataataatt cttatTTAAC tataatataat tgtgttgggt 120
tgaattaaag gtccgtatac tccggaatat taatagatca tggagataat taaaatgata 180
accatctcgc aaataaataa gtatTTact gtttgcgtaa cagtttgta ataaaaaaac 240
15 ctataaataat tccggattat tcataaccgtc ccaccatcgG gcgccgatct atg aca 296
Met Thr
1
20 aac ctg tca gat caa acc cag cag att gtt ccg ttc ata cgg agc ctt 344
Asn Leu Ser Asp Gln Thr Gln Gln Ile Val Pro Phe Ile Arg Ser Leu
5 10 15
25 ctg atg cca aca acc gga ccg gcg tcc att ccg gac gac acc ctg gag 392
Leu Met Pro Thr Thr Gly Pro Ala Ser Ile Pro Asp Asp Thr Leu Glu
20 25 30
30 aag cac act ctc agg tca gag acc tcg acc tac aat ttg act gtg ggg 440
Lys His Thr Leu Arg Ser Glu Thr Ser Thr Tyr Asn Leu Thr Val Gly
35 40 45 50
gac aca ggg tca ggg cta att gtc ttt ttc cct gga ttc cct ggc tca 488
Asp Thr Gly Ser Gly Leu Ile Val Phe Phe Pro Gly Phe Pro Gly Ser
55 60 65
35 att gtg ggt gct cac tac aca ctg cag ggc aat ggg aac tac aag ttc 536
Ile Val Gly Ala His Tyr Thr Leu Gln Gly Asn Gly Asn Tyr Lys Phe
70 75 80
40 gat cag atg ctc ctg act gcc cag aac cta ccg gcc agt tac aac tac 584
Asp Gln Met Leu Leu Thr Ala Gln Asn Leu Pro Ala Ser Tyr Asn Tyr
85 90 95
45 tgc agg cta gtg agt cgg agt ctc aca gtg agg tca agc aca ctt cct 632
Cys Arg Leu Val Ser Arg Ser Ile Thr Val Arg Ser Ser Thr Leu Pro
100 105 110
50 ggt ggc gtt tat gca cta aac ggc acc ata aac gcc gtg acc ttc caa 680
Gly Gly Val Tyr Ala Leu Asn Gly Thr Ile Asn Ala Val Thr Phe Gln
115 120 125 130
55 gga agc ctg agt gaa ctg aca gat gtt agc tac aat ggg ttg atg tct 728
Gly Ser Leu Ser Glu Leu Thr Asp Val Ser Tyr Asn Gly Leu Met Ser
135 140 145
55 gca aca gcc aac atc aac gac aaa att ggg aac gtc cta gta ggg gaa 776
Ala Thr Ala Asn Ile Asn Asp Lys Ile Gly Asn Val Leu Val Gly Glu
150 155 160

```

165	170	175	824
ggg gtc acc gtc ctc agc tta ccc aca tca tat gat ctt ggg tat gtg Gly Val Thr Val Leu Ser Leu Pro Thr Ser Tyr Asp Leu Gly Tyr Val			
180	185	190	872
5 agg ctt ggt gac ccc att ccc gca ata ggg ctt gac cca aaa atg gta Arg Leu Gly Asp Pro Ile Pro Ala Ile Gly Leu Asp Pro Lys Met Val			
195	200	205	210
10 gcc aca tgt gac agc agt gac agg ccc aga gtc tac acc ata act gca Ala Thr Cys Asp Ser Ser Asp Arg Pro Arg Val Tyr Thr Ile Thr Ala			
195	200	205	210
15 gcc gat gat tac caa ttc tca tca cag tac caa cca ggt ggg gta aca Ala Asp Asp Tyr Gln Phe Ser Ser Gln Tyr Gln Pro Gly Gly Val Thr			
215	220	225	968
20 atc aca ctg ttc tca gcc aac att gat gcc atc aca agc ctc agc gtt Ile Thr Leu Phe Ser Ala Asn Ile Asp Ala Ile Thr Ser Leu Ser Val			
230	235	240	1016
25 ggg gga gag ctc gtg ttt cga aca agc gtc cac ggc ctt gta ctg ggc Gly Gly Glu Leu Val Phe Arg Thr Ser Val His Gly Leu Val Leu Gly			
245	250	255	1064
30 30 ggc acc atc tac ctc ata ggc ttt gat ggg aca acg gta atc acc agg Ala Thr Ile Tyr Leu Ile Gly Phe Asp Gly Thr Thr Val Ile Thr Arg			
260	265	270	1112
35 gct gtg gcc gca aac aat ggg ctg acg acc ggc acc gac aac ctt atg Ala Val Ala Ala Asn Asn Gly Leu Thr Thr Gly Thr Asp Asn Leu Met			
275	280	285	1160
40 cca ttc aat ctt gtg att cca aca aac gag ata acc cag cca atc aca Pro Phe Asn Leu Val Ile Pro Thr Asn Glu Ile Thr Gln Pro Ile Thr			
295	300	305	1208
45 tcc atc aaa ctg gag ata gtg acc tcc aaa agt ggt ggt cag gca ggg Ser Ile Lys Leu Glu Ile Val Thr Ser Lys Ser Gly Gly Gln Ala Gly			
310	315	320	1256
50 50 gat cag atg tca tgg tcg gca aga ggg agc cta gcagtgcac tccatggc Asp Gln Met Ser Trp Ser Ala Arg Gly Ser Leu			
325	330		1309
55 caactatcca gggccctcc gtccgtcac gctagtgcc tacgaaagag tggcaacagg 1369			
atccgtcggt acggtcgctg gggtagccaa ctccgagctg atcccaaatac ctgaactagc 1429			
aaagaacctg gttacagaat acggccgatt tgacccagga gccatgaact acacaaaatt 1489			
55 gatactgagt gagagggacc gtcttggcat caagaccgtc tggccaacaa gggagtacac 1549			
tgactttcggt gaatacttca tggaggtggc cgacctcaac tctccctga agattgcagg 1609			
55 agcattcggc ttcaaagaca taatccgggc cataaggagg atagctgtgc cggtggc 1669			
cacattgttc ccacctgccc ctccccatgc ccatgcaatt gggaaagggtg tagactac 1729			
60 gctggccgat gaggcccagg ccgcttcagg aactgctcga gccgcgtcag gaaaagcaag 1789			

agctgcctca ggccgcataa ggcagctgac tctcgccctaa gcttgcgag aagtactaga 1849
 ggatcataat cagccatacc acattttag aggtttact tgctttaaaa aaccccccac 1909
 5 acctccccct gaacctgaaa cataaaatga atgcaattgt tgttgttaac ttgtttattg 1969
 cagttataa tggttacaaa taaagcaata gcatcacaaa tttcacaaat aaagcatttt 2029
 10 tttcaactgca ttctagttgt ggttgtcca aactcatcaa tgtatctt catgtctgga 2089
 tctgatcaact gcttgcgcct aggagatccg aaccagataa gtgaaatcta gttccaaact 2149
 attttgcattttt cgtatttagct tacgacgcta cacccagttc ccatctattt 2209
 15 tgtcaactctt ccctaaataa tccttaaaaa ctccatttcc acccctccca gttccaaact 2269
 attttgcgg cccacagcgg ggcatttttc ttccgttat gtttttaatc aaacatcctg 2329
 20 ccaactccat gtgacaaacc gtcatctcg gctactttt ctctgtcaca gaatgaaaat 2389
 ttttctgtca tctcttcgtt attaatgttt gtaattgact gaatatcaac gcttatttgc 2449
 agcctgaatg gcgaatggga cgcgcctgt agcggcgcataagcgcggc gggtgtggtg 2509
 25 gttacgcgca gctgtaccgc tacacttgcc agcgccttag cgcgcgtcc ttgcgtttc 2569
 ttcccttcct ttctcgccac gttcgccggc tttcccgtc aagctctaaa tcgggggctc 2629
 30 ccttagggt tccgatttag tgcttacgg cacctcgacc ccaaaaaact tgattagggt 2689
 gatggttcac gtagtggcc atcgccctga tagacggttt ttcgccttt gacgttggag 2749
 tccacgttct ttaatagtgg actcttggtc caaactggaa caacactcaa ccctatctcg 2809
 35 gtctattctt ttgatttata agggatttg ccgatttcgg cctattggtt aaaaaatgag 2869
 ctgatttaac aaaaattaa cgcgaatttt aacaaaatat taacgtttac aatttcaggt 2929
 40 ggcacttttc gggaaatgt ggcggaaacc cctattgtt tattttctaaata 2989
 aatatgtatc cgctcatgag acaataaccc tgataaatgc ttcaataata ttgaaaaagg 3049
 aagagtatga gtattcaaca tttccgtgc gcccatttc cctttttgc ggcattttgc 3109
 45 cttccgttt ttgctcaccc agaaacgctg gtgaaagtaa aagatgctga agatcagttg 3169
 ggtgcacgag tggttacat cgaactggat ctcaacagcg gtaagatct tgagagttt 3229
 50 cgcggaaag aacgtttcc aatgatgagc actttaaag ttctgtatg tggcgcggta 3289
 ttatcccgta ttgacgcccgg gcaagagcaa ctggcgtcc gcatacacta ttctcagaat 3349
 gacttggttg agtactcacc agtcacagaa aagcatctt cggatggcat gacagtaaga 3409
 55 gaattatgca gtgctgccat aaccatgagt gataacactg cggccaaactt acttctgaca 3469
 acgatcggag gaccgaagga gctaaccgt ttttgcaca acatggggga tcatgttaact 3529
 60 cgccttgatc gttggaaacc ggagctgaat gaagccatac caaacgacga gcgtgacacc 3589

acgatgcctg tagcaatggc aacaacgttg cgcaaactat taactggcga actacttact 3649
 ctagcttccc ggcaacaatt aatagactgg atggaggcgg ataaagttgc aggaccactt 3709
 5 ctgcgctcg cgccctccggc tggctggttt attgctgata aatctggagc cggtgagcgt 3769
 gggtctcgcg gtatcattgc agcactgggg ccagatggta agccctcccg tatactgtttt 3829
 atctacacga cggggagtcg ggcaactatg gatgaacgaa atagacagat cgctgagata 3889
 10 ggtgcctcac tgattaagca ttggtaactg tcagaccaag ttactcata tatacttttag 3949
 attgatttaa aacttcattt ttaatttaaa aggatctagg tgaagatcct ttttgataat 4009
 15 ctcatgacca aaatccctta acgtgagttt tcgttccact gagcgtcaga ccccgtagaa 4069
 aagatcaaag gatcttcttg agatcctttt tttctgcgcg taatctgctg cttgcaaaca 4129
 aaaaaaccac cgctaccagc ggtgggttgc ttgccggatc aagagctacc aactctttt 4189
 20 ccgaaggtaa ctggcttcag cagagcgcag ataccaaata ctgtccttct agttagccg 4249
 tagttaggcc accacttcaa gaactctgta gcaccgccta catacctcgc tctgctaata 4309
 25 ctgttaccag tggctgctgc cagtgccgat aagtcgtgtc ttaccgggtt ggactcaaga 4369
 cgatagttac cgataaggc gcagcggcgc ggctgaacgg ggggttcgtg cacacagccc 4429
 agcttggagc gaacgaccta caccgaactg agataacctac agcgtgagca ttgagaaagc 4489
 30 gccacgcttc ccgaaggggaa aaggcggac aggtatccgg taagcggcag ggtcggaaca 4549
 ggagagcgcgca cgagggagct tccagggggaa aacgcctgggt atctttatacg tcctgtcggg 4609
 35 tttcgccacc tctgacttga gcgtcgattt ttgtgatgct cgtcagggggg gcggagccta 4669
 tggaaaaacg ccagcaacgc ggcctttta cggttcctgg cctttgctg gcctttgtt 4729
 cacatgttct ttccctgcgtt atccccgtat tctgtggata accgtattac cgcctttgag 4789
 40 tgagctgata ccgctcgccg cagccgaacg accgagcgcgca gcgagtcagt gagcgaggaa 4849
 gcggaaagagc gcctgatgcg gtatcccctc cttacgcatac tgtgcggat ttcacacccgc 4909
 45 agaccagccg cgtaacctgg caaaatcggt tacgggttgcg taataaatgg atgcctgcg 4969
 taagcgggtg tggcgacataaactgtttt aaactgaaca aaatagatct aaactatgac 5029
 aataaagtct taaaactagac agaataatgg taaaactgaaa tcagtcaggat tatgctgtga 5089
 50 aaaagcatac tggacttttg ttatggctaa agcaaactct tcattttctg aagtgcataat 5149
 tgcccgctgt attaaagagg ggcgtggcca agggcatggt aaagactata ttgcggcgt 5209
 55 tgtgacaatt taccgaacaa ctccgcggcc gggaaagccga tctcggttgc aacgaattgt 5269
 taggtggcggtt tacttgggtc gatataaactt tgcatcactt cttccgtat gccaacttt 5329
 gtatagagag ccactgcggg atcgtcaccg taatctgctt gcacgtagat cacataagca 5389

ccaagcgcgt tggcctcatg cttgaggaga ttgatgagcg cggtggcaat gcccgcctc 5449
 cggtgctcgc cggagactgc gagatcatag atatagatct cactacgcgg ctgctcaaac 5509
 5 ctgggcagaa cgtaagccgc gagagcgcca acaaccgctt cttggtcgaa ggcagcaagc 5569
 gcgatgaatg tcttactacg gagcaagttc ccgaggtaat cggagtccgg ctgatgttgg 5629
 10 gagtaggtgg ctacgtctcc gaactcacga ccgaaaagat caagagcagc ccgcattggat 5689
 ttgacttggt cagggccgag cctacatgtg cgaatgatgc ccataacttga gccacctaacc 5749
 tttgttttag ggcgactgcc ctgctcgta acatcggtc tgctcgtaa catcggtgt 5809
 15 gctccataaac atcaaacatc gaccacggc gtaacgcgct tgctgcttgg atgcccggagg 5869
 catagactgt acaaaaaaaac agtcataaca agccatgaaa accgcccactg cgccgttacc 5929
 20 accgctgcgt tcggtaagg ttctggacca gttgcgtgag cgcatacgct acttgcattta 5989
 cagtttacga accgaacagg cttatgtcaa ctgggttcgt gccttcattcc gtttccacgg 6049
 tgtgcgtcac ccggcaacct tgggcagcag cgaagtcgag gcatttctgt cctggctggc 6109
 25 gaacgagcgc aaggttcgg tctccacgca tcgtcaggca ttggcggcct tgctgttctt 6169
 ctacggcaag gtgctgtgca cggatctgcc ctggcttcag gagatcggtt gaccccgcc 6229
 30 gtcgcggcgc ttgcccgtgg tgctgacccc ggatgaagtg gttcgcatcc tcggttttct 6289
 ggaaggcggag catcgttgt tcgcccagga ctctagctat agttctagtg gttggcctac 6349
 gtacccgtag tggctatggc agggcttgcc gccccgacgt tggctgcgag ccctgggcct 6409
 35 tcacccgaac ttgggggttg ggggtggggaa aaggaagaaa cgcggggcgtt ttgggtcccaa 6469
 tggggtctcg gtggggtatac gacagagtgc cagccctggg accgaacccc gcgtttatga 6529
 acaaacgacc caacacccgt gcgttttatt ctgtttttt attgcgtca taggcgggt 6589
 40 tccttcgggt attgtctcct tccgtgttgc agttagcctc ccccatctcc cggtaccgca 6649
 tgcctcgaga ctgcagggtc tagattcgaa agcggccgcg actagtgagc tcgtcgacgt 6709
 45 aggccttga attccggatc ctcactcaag gtcctcatca gagacggtcc tgatccagcg 6769
 gcccagccga ccagggggtc tctgtgttgg agcattgggt tttggcttgg gctttggtag 6829
 50 agcccgccctg ggattgcgtat gttcatctc catcgcaatc aagagcagat ctttcatctg 6889
 ttcttggtt gggccacgtc catggttgtat ttcatagact ttggcaactt cgtctatgaa 6949
 agcttgggtt ggctctgcct gtcctggagc cccgtagatc gacgttagctg cccttaggt 7009
 55 ttgttcttc gatgccaacc ggctttctc tgcatgcacg tagtctagat agtcctcggtt 7069
 tgggtccgggt atttctcggtt tggctgcctt gttctgttacc tggcctgggc ttggccctcg 7129
 gtgcccattt gatgctaccc attctgggtt tgcaaagtag atgcccattt gtcctccatctt 7189

ctttgagatc cgtgtgtctt tttccctctg tgcttcctct ggtgtggggc cccgagcctc 7249
 cactccgtag cctgctgtcc cgtacttggc cctttgcac ttgctgcctg cttgtggtgc 7309
 5 gtttgcaga aaatttcgca tccgatggc gttcgggtcg ctgagtgcga agttggccat 7369
 gtcagtcaca atcccattct cttccagcca catgaacaca ctgagtgcag attggaatag 7429
 10 tgggtccacg ttggctgctg cttccattgc tctgacggca ctctcgagtt cgggggtctc 7489
 tttgaactct gatgcagcca tggccctg aaaatacagg ttttcggtgc ttggatatc 7549
 gtaatcgtga tggtgatggt gatggtagta cgacatggtt tcggac 7595
 15
 <210> 4
 <211> 333
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 20 <220>
 <223> Plásmido pFBD/pVP2-his-VP3
 <400> 4
 25 Met Thr Asn Leu Ser Asp Gln Thr Gln Gln Ile Val Pro Phe Ile Arg
 1 5 10 15
 Ser Leu Leu Met Pro Thr Thr Gly Pro Ala Ser Ile Pro Asp Asp Thr
 20 25 30
 30 Leu Glu Lys His Thr Leu Arg Ser Glu Thr Ser Thr Tyr Asn Leu Thr
 35 40 45
 Val Gly Asp Thr Gly Ser Gly Leu Ile Val Phe Phe Pro Gly Phe Pro
 35 50 55 60
 Gly Ser Ile Val Gly Ala His Tyr Thr Leu Gln Gly Asn Gly Asn Tyr
 65 70 75 80
 40 Lys Phe Asp Gln Met Leu Leu Thr Ala Gln Asn Leu Pro Ala Ser Tyr
 85 90 95
 Asn Tyr Cys Arg Leu Val Ser Arg Ser Leu Thr Val Arg Ser Ser Thr
 100 105 110
 45 Leu Pro Gly Gly Val Tyr Ala Leu Asn Gly Thr Ile Asn Ala Val Thr
 115 120 125
 Phe Gln Gly Ser Leu Ser Glu Leu Thr Asp Val Ser Tyr Asn Gly Leu
 50 130 135 140
 Met Ser Ala Thr Ala Asn Ile Asn Asp Lys Ile Gly Asn Val Leu Val
 145 150 155 160
 55 Gly Glu Gly Val Thr Val Leu Ser Leu Pro Thr Ser Tyr Asp Leu Gly
 165 170 175
 Tyr Val Arg Leu Gly Asp Pro Ile Pro Ala Ile Gly Leu Asp Pro Lys
 180 185 190

Met Val Ala Thr Cys Asp Ser Ser Asp Arg Pro Arg Val Tyr Thr Ile
 195 200 205

5 Thr Ala Ala Asp Asp Tyr Gln Phe Ser Ser Gln Tyr Gln Pro Gly Gly
 210 215 220

Val Thr Ile Thr Leu Phe Ser Ala Asn Ile Asp Ala Ile Thr Ser Leu
 225 230 235 240

10 Ser Val Gly Gly Glu Leu Val Phe Arg Thr Ser Val His Gly Leu Val
 245 250 255

Leu Gly Ala Thr Ile Tyr Leu Ile Gly Phe Asp Gly Thr Thr Val Ile
 15 260 265 270

Thr Arg Ala Val Ala Ala Asn Asn Gly Leu Thr Thr Gly Thr Asp Asn
 275 280 285

20 Leu Met Pro Phe Asn Leu Val Ile Pro Thr Asn Glu Ile Thr Gln Pro
 290 295 300

Ile Thr Ser Ile Lys Leu Glu Ile Val Thr Ser Lys Ser Gly Gly Gln
 25 305 310 315 320

Ala Gly Asp Gln Met Ser Trp Ser Ala Arg Gly Ser Leu
 325 330

30 <210> 5
 <211> 35
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> Oligo III

<400> 5
 40 ggcgcagatct atgacaaaacc tgtcagatca aaccc 35

<210> 6
 <211> 34
 <212> DNA
 45 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Oligo IV

50 <400> 6
 gcgcaagctt aggcgagagt cagctgcctt atgc 34

<210> 7
 55 <211> 9600
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

<220>
 60 <223> Plásmido pESCURA/pVP2-VP3-GFP

5 <220>
 <221> promotor
 <222> (5649)..(5859)
 <223> Promotor 1 (pVP2)

10 <220>
 <221> promotor
 <222> (7402)..(8080)
 <223> Promotor 2 (VP3-GFP)

15 <220>
 <221> CDS
 <222> (8086)..(9597)
 <223> VP3-GFP ORF

20 <400> 7
 ggcgcacta gatatcgatgg attacaagga tgacgacgat aagatctgag ctcttaatta 60
 acaattcttc gccagaggtt tggtaagtc tccaatcaag gttgtcggt tgcgtacatt 120
 gccagaaaatt tacgaaaaga tggaaaaggg tcaaattcggtt ggtagatacg ttgttgacac 180
 25 ttctaaataa gcgaatttct tatgatttat gatttttatt attaaataag ttataaaaaaa 240
 aataagtgtt tacaaatttt aaagtgactc ttaggttttta aaacgaaaat tcttattctt 300
 30 gagtaactct ttcctgttagg tcaggttgct ttctcaggta tagcatgagg tcgctccaat 360
 tcagctgcatt taatgaatcg gccaacgcgc ggggagagggc ggtttgcgtt ttggggcgtc 420
 ttccgcttcc tcgctcactg actcgctgctg ctcgggtcggtt cggctgcggc gagcggtatc 480
 35 agctcactca aaggcggtaa tacggttatc cacagaatca ggggataacg cagggaaagaa 540
 catgtgagca aaaggccagc aaaaggccag gaaccgtaaa aaggccgcgt tgctggcggtt 600
 40 tttccatagg ctccgccccctgctgacgagca tcacaaaaat cgacgctcaa gtcagagggtg 660
 gcgaaaccccg acaggactat aaagatacca ggcgtttccc cctggaaagct ccctcgctgcg 720
 ctctcctgtt ccgaccctgc cgcttaccgg atacctgtcc gccttctcc ctgcggaaag 780
 45 cgtggcgctt tctcatagct cacgctgttagt gatatctcagt tcgggtgttagg tcgttcgcgc 840
 caagctgggc tgggtgcacg aaccccccgt tcagccgcac cgctgcgcct tatccggtaa 900
 50 ctatcgcttt gagtccaacc cggttaagaca cgacttatcg ccactggcag cagccactgg 960
 taacaggatt agcagagcga ggtatgttagg cggtgcatac gagttcttga agtgggtggcc 1020
 taactacggc tacactagaa ggacagtatt tggtatctgc gctctgctga agccagttac 1080
 55 cttcgaaaaa agagttggta gctcttgatc cggcaaacaa accaccgctg gtagcggtgg 1140
 ttttttggtt tgcaaggcagc agattacgcg cagaaaaaaa ggatctcaag aagatccttt 1200
 60 gatctttct acggggtctg acgctcagtg gaacgaaaac tcacgttaag ggatttgggt 1260

catgagatta tcaaaaagga tcttcaccta gatccttttta aattaaaaat gaagttttaa 1320
 5 atcaatctaa agtatatatg agtaaacttg gtctgacagt taccaatgct taatcagtga 1380
 ggcacctatc tcagcgatct gtctatttcg ttcatccata gttgcctgac tccccgtcgt 1440
 gtagataact acgatacggg agggcttacc atctggcccc agtgctgcaa tgataccgac 1500
 10 agaccacgc tcacccggctc cagatttatac agaataaac cagccagccg gaagggccga 1560
 gcgagaagt ggtcctgcaa ctttatccgc ctccatccag tctattaatt gttgccggga 1620
 15 agctagagta agtagttcgc cagttaatag tttgcgcaac gttgttgcac ttgctacagg 1680
 catcgtggtg tcacgctcgt cgtttggat ggcttcattc agctccgggtt cccaaacgatc 1740
 aaggcgagtt acatgatccc ccatgttgcg caaaaaagcg gttagctcct tcggcctcc 1800
 20 gatcgttgtc agaagtaagt tggccgcagt gttatcactc atggttatgg cagcactgca 1860
 taattctctt actgtcatgc catccgtaaag atgctttct gtgactgggt agtactcaac 1920
 25 caagtcattc tgagaatagt gtatgcggcg accgagttgc tcttgcggcg cgtcaatacg 1980
 ggataatacc ggcacata gcagaacttt aaaagtgcgc atcattggaa aacgttcttc 2040
 gggcgaaaaa ctctcaagga tcttaccgct gttgagatcc agttcgatgt aacccactcg 2100
 30 tgcacccaaac tgatcttcag catctttac tttcaccagc gtttctgggt gagcaaaaac 2160
 aggaaggcaa aatgccgcaa aaaaggaaat aagggcgaca cggaaatgtt gaataactcat 2220
 35 actcttcctt tttcaatatt attgaagcat ttatcagggt tattgtctca tgagcggata 2280
 catatttggaa tgtatttaga aaaataaaaca aataggggtt cgcgcacat ttccccgaaa 2340
 agtgccaccc gaacgaagca tctgtgcttc atttttagaa aaaaaatgc aacgcgagag 2400
 40 cgctaatttt tcaaacaag aatctgagct gcattttac agaacagaaaa tgcaacgcga 2460
 aagcgctatt ttaccaacga agaatctgtg cttcattttt gtaaaacaaa aatgcaacgc 2520
 45 gagagcgcta atttttcaaa caaagaatct gagctgcatt tttacagaac agaaatgcaa 2580
 cgcgagagcg ctatcttacc aacaaagaat ctatacttct ttttgttct aaaaaatgc 2640
 atcccgagag cgctatctt ctaacaaagc atcttagatt acttttttc tccttgc 2700
 50 gctctataat gcagtctttt gataactttt tgcaactgt tagtgcgtt aagtttgc 2760
 ggctactttt gtgtcttattt tctcttccat aaaaaaagcc tgactccact tcccgcttt 2820
 actgattact agcgaagctg cgggtgcatt tttcaagat aaaggcatcc ccgattatat 2880
 55 tctataccga tgtggattgc gcatactttg tgaacagaaa gtgatagcgt tgatgattct 2940
 tcattggtca gaaaattatg aacggtttct tctatttgt ctctatatac tacgtatagg 3000
 60 aaatgtttac atttcgtat tgtttgcgt tcactctatg aatagttctt actacaattt 3060

ttttgtctaa agagtaatac tagagataaa cataaaaaat gtagaggtcg agtttagatg 3120
 5 caagttcaag gagcgaaagg tggatggta gtttatata gatatagca cagagatata 3180
 tagcaaagag atactttga gcaatgttg tggaaagcggt attcgcaata ttttagtagc 3240
 tcgttacagt ccgggtgcgtt tttggtttt tgaaagtgcg tcttcagagc gctttggtt 3300
 10 ttcaaaaagcg ctctgaagtt cctatacttt ctagagaata ggaacttcgg aataggaact 3360
 tcaaaagcggtt tccgaaaaacg agcgcttcgg aaaatgcaac gcgagctgcg cacatacagc 3420
 15 tcactgttca cgtcgcaccc atatctgcgt gttgcctgta tatatatata catgagaaga 3480
 acggcatagt gcgtgtttat gcttaaatgc gtacttata gctgttattt atgtaggatg 3540
 aaaggtagtc tagtacactcc tttgatattt tcccattcca tgcggggat cgtatgcctc 3600
 20 cttagcact acccttttagc ttttctata gctgccactc ctaatttggaa ttagtctcat 3660
 ccttcaatgc ttttcaatttcc tttgatattt gatcatacta agaaaccatt attatcatga 3720
 25 cattaaccta taaaaatagg cgtatcacga ggcccttcg tctcgccgt ttcgggtatg 3780
 acggtgaaaa cctctgacac atgcagctcc cggagacggt cacagcttgt ctgtaaacgg 3840
 atgcccggag cagacaagcc cgtcaggcg cgtcagcggg tttggcggg tttccgggct 3900
 30 ggcttaacta tgcggcatca gagcagattt tactgagatg gcaccatacc acagctttc 3960
 aattcaattt atcattttt ttttattctt ttttttattt tcggtttctt tgaaattttt 4020
 35 ttgattcggt aatctccgaa cagaaggaag aacgaaggaa ggagcacaga ctttagattgg 4080
 tatataacg catatgttgtt gttgaagaaa catgaaattt cccagtattt ttaacccaaac 4140
 tgcacagaac aaaaacctgc aggaaacgaa gataaatcat gtcgaaagct acatataagg 4200
 40 aacgtgctgc tactcatcct agtcctgttg ctgccaagct atttaatatc atgcacgaaa 4260
 agcaaacaaa cttgtgtgct tcattggatg ttcgtaccac caaggaattt ctggagttt 4320
 ttgaagcatt aggtccaaa atttggatc taaaaacaca tttggatatac ttgactgatt 4380
 45 ttccatgga gggcacagtt aagccgctaa aggatttac cgccaaatgtac aattttttac 4440
 tttcgaaga cagaaaattt gctgacattt gtaatacagt caaattgcag tactctgcgg 4500
 50 gtgtatacag aatagcagaa tgggcagaca ttacgaatgc acacgggttg gtggcccg 4560
 gtattgttag cggttgaag caggcggcag aagaagtaac aaaggaaacct agaggcctt 4620
 tgatgttagc agaattgtca tgcaagggtt ccctatctac tggagaatata actaaggta 4680
 55 ctgttgcacat tgcgaagagc gacaaagatt ttgttatcgg ctttattgtt caaagagaca 4740
 tgggtgaaag agatgaaggt tacgattgtt tgattatgac acccgggttg ggttttagatg 4800
 60 acaagggaga cgcattgggt caacagtata gaaccgtgga ttagtggc tctacaggat 4860

5 ctgacattat tattgttgg aagggactat ttgcaaagg aagggatgct aaggtagagg 4920
gtgaacgtta cagaaaagca ggctgggaag catattttag aagatgcggc cagcaaaact 4980
aaaaaaactgt attataagta aatgcattgt tactaaactc acaaattaga gcttcaattt 5040
aattatatca gttattaccc tatgcgggtgt gaaataccgc acagatgcgt aaggagaaaa 5100
10 taccgcattca ggaaattgtt aacgttaata ttttggtaaa attcgctta aattttgtt 5160
aaatcagctc attttttaac caataggccg aaatcgccaa aatcccttat aaatcaaaag 5220
15 aatagaccga gatagggttg agtgttggtc cagttggaa caagagtcca ctattaaaga 5280
acgtggactc caacgtcaaa gggcgaaaaa ccgtctatca gggcgatggc ccactacgt 5340
aaccatcacc ctaatcaagt ttttgggtt cgaggtgccc taaagcacta aatcggaacc 5400
20 ctaaaggagccccgattt agagcttgc gggaaagcc ggcgaacgtg gcgagaaagg 5460
aagggaaagaa agcggaaagga gcgccgccta gggcgctggc aagtgttagcg gtcacgctgc 5520
25 gcgttaaccac cacacccgccc gcgcttaatg cgccgctaca gggcgctcg cgccattcgc 5580
cattcaggct gcgcaactgt tgggaaggc gatcggtgcg ggcctcttcg ctattacgccc 5640
agctggatct tcgagcgtcc caaaaccttc tcaagcaagg ttttcaagtat aatgttacat 5700
30 gcgtacacgc gtctgtacag aaaaaaaaga aaaatttggaa atataaataa cgttcttaat 5760
actaacataa ctataaaaaa ataaataggg acctagactt caggttgtct aactccttcc 5820
35 ttttcggta gagcgatct tagctagccg cggtagccaag cttagggcgag agtcagctgc 5880
cttatgcggc ctgaggcagc tcttgcctt cctgacgcgg ctcgagcagt tcctgaagcg 5940
gcctggcct catcgccag caggtgtct acaccttccc caattgcattt ggcctaggga 6000
40 gcccggcagg ggaacaatgt ggagaccacc ggcacagcta tcctccttat ggccaccc 6060
atgtcttga agccgaatgc tcctgcaatc ttcagggag agttgaggc ggcacaccc 6120
atgaagtatt cacgaaagtc agtgtactcc cttgttggcc agacggtctt gatgccaaga 6180
45 cggccctct cactcagtat caattttgtt tagttcatgg tcctgggtc aaatcgcccg 6240
tattctgtaa ccaggttctt tgcttagttca ggatttggga tcagctcgaa gttgctcacc 6300
50 ccagcgaccc taacgacggc tcctgttgc actcttcgtt agggccactag cgtgacggga 6360
cgaggccc ctggatagtt gccaccatgg atcgtcaactg ctggctccc tcctggcgcac 6420
catgacatct gatcccctgc ctgaccacca cttttggagg tcactatctc cagtttgcgt 6480
55 gatgtgattt gctgggttat ctcgtttgtt ggaatcacaa gattgaatgg cataagggtt 6540
tcggtgccgg tcgtcagcccc attgtttgcg gccacagccc tggtgattac cgttgcacc 6600
60 tcaaagccta tgaggtagat ggtggccccc agtacaaggc cgtggacgct tggcgtccca 6660

acgagctctc ccccaacgct gaggcttgtg atggcatcaa tgttggctga gaacagtgtg 6720
 5 attgttaccc cacctggttg gtactgtat gagaatttgtt aatcatcgcc tgcagttatg 6780
 gtgttagactc tgggcctgtc actgctgtca catgtggcta ccattttgg gtcaagccct 6840
 attgcgggaa tggggtcacc aagcctcaca tacccaagat catatgtatgt gggtaagctg 6900
 10 aggacggtga cccctcccc tactaggacg ttcccaattt tgtcgttcat gttggctgtt 6960
 gcagacatca acccattgtt gctaacatct gtcagttcac tcaggcttcc ttggaaggtc 7020
 15 acggcggtta tggtgccgtt tagtgcataa acgccaccag gaagtgtgt tgacctact 7080
 gtgagactcc gactcaactg cctgcagtag ttgtaactgg ccggtaggtt ctggcagtc 7140
 aggagcatct gatcgaactt gtatcccata ttgcccgtca gtgtgttagt agcaccacaca 7200
 20 attgagccag ggaatccagg gaaaaagaca attagccctg accctgtgtc ccccacagtc 7260
 aaattgttagg tcgaggtctc tgacctgaga gtgtgtttt ccagggtgtc gtccggaaatg 7320
 25 gacgccggtc cggttgggtt catcagaagg ctccgtatga acggaacaat ctgctgggtt 7380
 tgatctgaca ggtttgcata agatccgggg tttttctcc ttgacgttaa agtataagagg 7440
 tatattaaca atttttgtt gatacttttta ttacatttga ataagaagta atacaaccg 7500
 30 aaaatgttga aagtatttagt taaagtgggtt atgcagtttt tgcatattata tatctgttaa 7560
 tagatcaaaa atcatcgctt cgctgattaa ttacccaga aataaggcta aaaaactaat 7620
 35 cgcattatca tcctatggtt gttaatttga ttcgttcatt tgaaggtttgg tggggccagg 7680
 ttactgccaa ttttcctct tcataaccat aaaagctagt attgtagaat ctttattgtt 7740
 cggagcagtg cggcgcgagg cacatctgctg tttcaggaac ggcacccgtg aagacgagga 7800
 40 cgcacggagg agagtcttcc ttccggagggc tgcacccgc tcggcggctt ctaatccgt 7860
 cttcaatata gcaatgagca gttaagcgta ttactgaaag ttccaaagag aaggttttt 7920
 taggctaaga taatggggctt cttacattt ccacaacata taagtaagat tagatatgga 7980
 45 tatgtatatg gatatgtata tggtggtaat gccatgtat atgattattt aactctttg 8040
 cgtccatcca aaaaaaaaaaagt aagaattttt gaaaattcga attcg atg gct gca tca 8097
 Met Ala Ala Ser
 50 1
 - gag ttc aaa gag acc ccc gaa ctc gag agt gcc gtc aga gca atg gaa 8145
 Glu Phe Lys Glu Thr Pro Glu Leu Glu Ser Ala Val Arg Ala Met Glu
 5 10 15 20
 55 gca gca gcc aac gtg gac cca cta ttc caa tct gca ctc agt gtg ttc 8193
 Ala Ala Ala Asn Val Asp Pro Leu Phe Gln Ser Ala Leu Ser Val Phe
 25 30 35
 60 atg tgg ctg gaa gag aat ggg att gtg act gac atg gcc aac ttc gca 8241

	Met Trp Leu Glu Glu Asn Gly Ile Val Thr Asp Met Ala Asn Phe Ala		
	40	45	50
5	ctc agc gac ccg aac gcc cat cgg atg cga aat ttt ctt gca aac gca Leu Ser Asp Pro Asn Ala His Arg Met Arg Asn Phe Leu Ala Asn Ala	55	60
	65		
10	cca caa gca ggc agc aag tcg caa agg gcc aag tac ggg aca gca ggc Pro Gln Ala Gly Ser Lys Ser Gln Arg Ala Lys Tyr Gly Thr Ala Gly	70	75
	80		
15	tac gga gtg gag gct cgg ggc ccc aca cca gag gaa gca cag agg gaa Tyr Gly Val Glu Ala Arg Gly Pro Thr Pro Glu Glu Ala Gln Arg Glu	85	90
	95		100
20	aaa gac aca cgg atc tca aag aag atg gag acc atg ggc atc tac ttt Lys Asp Thr Arg Ile Ser Lys Lys Met Glu Thr Met Gly Ile Tyr Phe	105	110
	115		
25	gca aca cca gaa tgg gta gca ctc aat ggg cac cga ggg cca agc cca Ala Thr Pro Glu Trp Val Ala Leu Asn Gly His Arg Gly Pro Ser Pro	120	125
	130		
30	ggc cag gta aag tac tgg cag aac aaa cga gaa ata ccg gac cca aac Gly Gln Val Lys Tyr Trp Gln Asn Lys Arg Glu Ile Pro Asp Pro Asn	135	140
	145		
35	gag gac tat cta gac tac gtg cat gca gag aag agc cgg ttg gca tca Glu Asp Tyr Leu Asp Tyr Val His Ala Glu Lys Ser Arg Leu Ala Ser	150	155
	160		
40	gaa gaa caa atc cta agg gca gct acg tcg atc tac ggg gct cca gga Glu Glu Gln Ile Leu Arg Ala Ala Thr Ser Ile Tyr Gly Ala Pro Gly	165	170
	175		180
45	cag gca gag cca ccc caa gct ttc ata gac gaa gtt gcc aaa gtc tat Gln Ala Glu Pro Pro Gln Ala Phe Ile Asp Glu Val Ala Lys Val Tyr	185	190
	195		
50	gaa atc aac cat gga cgt ggc cca aac caa gaa cag atg aaa gat ctg Glu Ile Asn His Gly Arg Gly Pro Asn Gln Glu Gln Met Lys Asp Leu	200	205
	210		
55	ctc ttg act gcg atg gag atg aag cat cgc aat ccc agg cgg gct cta Leu Leu Thr Ala Met Glu Met Lys His Arg Asn Pro Arg Arg Ala Leu	215	220
	225		
60	cca aag ccc aag cca aaa ccc aat gct cca aca cag aga ccc cct ggt Pro Lys Pro Lys Pro Asn Ala Pro Thr Gln Arg Pro Pro Gly	230	235
	240		
65	cgg ctg ggc cgc tgg atc agg acc gtc tct gat gag gac ctt gag gga Arg Leu Gly Arg Trp Ile Arg Thr Val Ser Asp Glu Asp Leu Glu Gly	245	250
	255		260
70	tcc atc gcc acc atg gtg agc aag ggc gag gag ctg ttc acc ggg gtg Ser Ile Ala Thr Met Val Ser Lys Gly Glu Glu Leu Phe Thr Gly Val	265	270
	275		
75	gtg ccc atc ctg gtc gag ctg gac ggc gac gta aac ggc cac aag ttc		8961

	Val Pro Ile Leu Val Glu Leu Asp Gly Asp Val Asn Gly His Lys Phe		
	280	285	290
5	agc gtg tcc ggc gag ggc gag ggc gat gcc acc tac ggc aag ctg acc Ser Val Ser Gly Glu Gly Glu Gly Asp Ala Thr Tyr Gly Lys Leu Thr 295 300 305		9009
10	ctg aag ttc atc tgc acc acc ggc aag ctg ccc gtg ccc tgg ccc acc Leu Lys Phe Ile Cys Thr Thr Gly Lys Leu Pro Val Pro Trp Pro Thr 310 315 320		9057
15	ctc gtg acc acc ctg acc tac ggc gtg cag tgc ttc agc cgc tac ccc Leu Val Thr Thr Leu Thr Tyr Gly Val Gln Cys Phe Ser Arg Tyr Pro 325 330 335 340		9105
20	gac cac atg aag cag cac gac ttc ttc aag tcc gcc atg ccc gaa ggc Asp His Met Lys Gln His Asp Phe Phe Lys Ser Ala Met Pro Glu Gly 345 350 355		9153
25	tac gtc cag gag cgc acc atc ttc ttc aag gac gac ggc aac tac aag Tyr Val Gln Glu Arg Thr Ile Phe Phe Lys Asp Asp Gly Asn Tyr Lys 360 365 370		9201
30	acc cgc gcc gag gtg aag ttc gag ggc gac acc ctg gtg aac cgc atc Thr Arg Ala Glu Val Lys Phe Glu Gly Asp Thr Leu Val Asn Arg Ile 375 380 385		9249
35	gag ctg aag ggc atc gac ttc aag gag gac ggc aac atc ctg ggg cac Glu Leu Lys Gly Ile Asp Phe Lys Glu Asp Gly Asn Ile Leu Gly His 390 395 400		9297
40	aag ctg gag tac aac tac aac agc cac aac gtc tat atc atg gcc gac Lys Leu Glu Tyr Asn Tyr Asn Ser His Asn Val Tyr Ile Met Ala Asp 405 410 415 420		9345
45	aag cag aag aac ggc atc aag gtg aac ttc aag atc cgc cac aac atc Lys Gln Lys Asn Gly Ile Lys Val Asn Phe Lys Ile Arg His Asn Ile 425 430 435		9393
50	gag gac ggc agc gtg cag ctc gcc gac cac tac cag cag aac acc ccc Glu Asp Gly Ser Val Gln Leu Ala Asp His Tyr Gln Gln Asn Thr Pro 440 445 450		9441
55	atc ggc gac ggc ccc gtg ctg ctg ccc gac aac cac tac ctg agc acc Ile Gly Asp Gly Pro Val Leu Leu Pro Asp Asn His Tyr Leu Ser Thr 455 460 465		9489
60	cag tcc gcc ctg agc aaa gac ccc aac gag aag cgc gat cac atg gtc Gln Ser Ala Leu Ser Lys Asp Pro Asn Glu Lys Arg Asp His Met Val 470 475 480		9537
65	ctg ctg gag ttc gtg acc gcc ggg atc act ctc ggc atg gac gag Leu Leu Glu Phe Val Thr Ala Ala Gly Ile Thr Leu Gly Met Asp Glu 485 490 495 500		9585
70	ctg tac aag taa agc Leu Tyr Lys		9600

<210> 8
 <211> 503
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 5
 <220>
 <223> Plásmido pESCURA/pVP2-VP3-GFP
 <400> 8
 10 Met Ala Ala Ser Glu Phe Lys Glu Thr Pro Glu Leu Glu Ser Ala Val
 1 5 10 15
 Arg Ala Met Glu Ala Ala Asn Val Asp Pro Leu Phe Gln Ser Ala
 15 20 25 30
 Leu Ser Val Phe Met Trp Leu Glu Glu Asn Gly Ile Val Thr Asp Met
 35 40 45
 Ala Asn Phe Ala Leu Ser Asp Pro Asn Ala His Arg Met Arg Asn Phe
 20 50 55 60
 Leu Ala Asn Ala Pro Gln Ala Gly Ser Lys Ser Gln Arg Ala Lys Tyr
 65 70 75 80
 Gly Thr Ala Gly Tyr Gly Val Glu Ala Arg Gly Pro Thr Pro Glu Glu
 25 85 90 95
 Ala Gln Arg Glu Lys Asp Thr Arg Ile Ser Lys Lys Met Glu Thr Met
 30 100 105 110
 Gly Ile Tyr Phe Ala Thr Pro Glu Trp Val Ala Leu Asn Gly His Arg
 115 120 125
 Gly Pro Ser Pro Gly Gln Val Lys Tyr Trp Gln Asn Lys Arg Glu Ile
 35 130 135 140
 Pro Asp Pro Asn Glu Asp Tyr Leu Asp Tyr Val His Ala Glu Lys Ser
 145 150 155 160
 40 Arg Leu Ala Ser Glu Glu Gln Ile Leu Arg Ala Ala Thr Ser Ile Tyr
 165 170 175
 Gly Ala Pro Gly Gln Ala Glu Pro Pro Gln Ala Phe Ile Asp Glu Val
 45 180 185 190
 Ala Lys Val Tyr Glu Ile Asn His Gly Arg Gly Pro Asn Gln Glu Gln
 195 200 205
 Met Lys Asp Leu Leu Leu Thr Ala Met Glu Met Lys His Arg Asn Pro
 50 210 215 220
 Arg Arg Ala Leu Pro Lys Pro Lys Pro Asn Ala Pro Thr Gln
 225 230 235 240
 55 Arg Pro Pro Gly Arg Leu Gly Arg Trp Ile Arg Thr Val Ser Asp Glu
 245 250 255
 Asp Leu Glu Gly Ser Ile Ala Thr Met Val Ser Lys Gly Glu Glu Leu
 60 260 265 270

Phe Thr Gly Val Val Pro Ile Leu Val Glu Leu Asp Gly Asp Val Asn
 275 280 285

5 Gly His Lys Phe Ser Val Ser Gly Glu Gly Glu Gly Asp Ala Thr Tyr
 290 295 300

Gly Lys Leu Thr Leu Lys Phe Ile Cys Thr Thr Gly Lys Leu Pro Val
 305 310 315 320

10 Pro Trp Pro Thr Leu Val Thr Thr Leu Thr Tyr Gly Val Gln Cys Phe
 325 330 335

Ser Arg Tyr Pro Asp His Met Lys Gln His Asp Phe Phe Lys Ser Ala
 340 345 350

15 Met Pro Glu Gly Tyr Val Gln Glu Arg Thr Ile Phe Phe Lys Asp Asp
 355 360 365

Gly Asn Tyr Lys Thr Arg Ala Glu Val Lys Phe Glu Gly Asp Thr Leu
 20 370 375 380

Val Asn Arg Ile Glu Leu Lys Gly Ile Asp Phe Lys Glu Asp Gly Asn
 385 390 395 400

25 Ile Leu Gly His Lys Leu Glu Tyr Asn Tyr Asn Ser His Asn Val Tyr
 405 410 415

Ile Met Ala Asp Lys Gln Lys Asn Gly Ile Lys Val Asn Phe Lys Ile
 30 420 425 430

Arg His Asn Ile Glu Asp Gly Ser Val Gln Leu Ala Asp His Tyr Gln
 435 440 445

Gln Asn Thr Pro Ile Gly Asp Gly Pro Val Leu Leu Pro Asp Asn His
 35 450 455 460

Tyr Leu Ser Thr Gln Ser Ala Leu Ser Lys Asp Pro Asn Glu Lys Arg
 465 470 475 480

40 Asp His Met Val Leu Leu Glu Phe Val Thr Ala Ala Gly Ile Thr Leu
 485 490 495

Gly Met Asp Glu Leu Tyr Lys
 45 500

<210> 9
 <211> 33
 <212> DNA
 50 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Oligo V...

55 <400> 9
 gcgcgaattc gatggcatca gagttcaaag aga

60 <210> 10
 <211> 32

<212> DNA
 <213> Secuencia artificial

 5 <220>
 <223> Oligo VI

 <400> 10
 cgccggatccc tcaaggcct catcagagac gg 32

10 <210> 11
 <211> 36
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 15 <220>
 <223> Oligo CD8 A

 <400> 11
 20 aacaggaca gttatgtccc aagcgcagaa caaata 36

25 <210> 12
 <211> 36
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Oligo CD8 B

 <400> 12
 tattttttct gcgttggga cataactgtc ctcgtt 36

35 <210> 13
 <211> 5676
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <223> Plásmido pFB/his-CD8-VP3

45 <220>
 <221> promotor
 <222> (1)..(129)
 <223> Promotor de poliedrina

50 <220>
 <221> CDS
 <222> (147)..(1043)
 <223> His-CD8-VP3 ORF

55 <220>
 <221> CDS
 <222> (222)..(257)
 <223> His-CD8 ORF

60 <400> 13
 atcatggaga taattaaaat gataaccatc tcgcaaataa ataagtatcc tactgttttc 60

5	gtaacagttt tgtaataaaa aaacctataa atattccgga ttattcatac cgtcccacca	120	
	tcgggcgcgg atctcggtcc gaaacc atg tcg tac tac cat cac cat cac cat	173	
	Met Ser Tyr Tyr His His His His His His		
10	1 5		
	cac gat tac gat atc cca acg acc gaa aac ctg tat ttt cag ggc gcg	221	
	His Asp Tyr Asp Ile Pro Thr Thr Glu Asn Leu Tyr Phe Gln Gly Ala		
	10 15 20 25		
15	aac gag gac agt tat gtc cca agc gca gaa caa ata gcc gcc atg gct	269	
	Asn Glu Asp Ser Tyr Val Pro Ser Ala Glu Gln Ile Ala Ala Met Ala		
	30 35 40		
20	gca tca gag ttc aaa gag acc ccc gaa ctc gag agt gcc gtc aga gca	317	
	Ala Ser Glu Phe Lys Glu Thr Pro Glu Leu Glu Ser Ala Val Arg Ala		
	45 50 55		
25	atg gaa gca gca gcc aac gtg gac cca cta ttc caa tct gca ctc agt	365	
	Met Glu Ala Ala Asn Val Asp Pro Leu Phe Gln Ser Ala Leu Ser		
	60 65 70		
	gtg ttc atg tgg ctg gaa gag aat ggg att gtg act gac atg gcc aac	413	
	Val Phe Met Trp Leu Glu Glu Asn Gly Ile Val Thr Asp Met Ala Asn		
	75 80 85		
30	tcc gca ctc agc gac ccg aac gcc cat cgg atg cga aat ttt ctt gca	461	
	Phe Ala Leu Ser Asp Pro Asn Ala His Arg Met Arg Asn Phe Leu Ala		
	90 95 100 105		
35	aac gca cca caa gca ggc agc aag tcg caa agg gcc aag tac ggg aca	509	
	Asn Ala Pro Gln Ala Gly Ser Lys Ser Gln Arg Ala Lys Tyr Gly Thr		
	110 115 120		
40	gca ggc tac gga gtg gag gct cgg ggc ccc aca cca gag gaa gca cag	557	
	Ala Gly Tyr Gly Val Glu Ala Arg Gly Pro Thr Pro Glu Ala Gln		
	125 130 135		
45	agg gaa aaa gac aca ccg atc tca aag aag atg gag acc atg ggc atc	605	..
	Arg Glu Lys Asp Thr Arg Ile Ser Lys Lys Met Glu Thr Met Gly Ile		
	140 145 150		
50	tac ttt gca aca cca gaa tgg gta gca ctc aat ggg cac cga ggg cca	653	
	Tyr Phe Ala Thr Pro Glu Trp Val Ala Leu Asn Gly His Arg Gly Pro		
	155 160 165		
55	agc cca ggc cag gta aag tac tgg cag aac aaa cga gaa ata ccg gac	701	
	Ser Pro Gly Gln Val Lys Tyr Trp Gln Asn Lys Arg Glu Ile Pro Asp		
	170 175 180 185		
	cca aac gag gac tat cta gac tac gtg cat gca gag aag agc ccg ttg	749	
	Pro Asn Glu Asp Tyr Leu Asp Tyr Val His Ala Glu Lys Ser Arg Leu		
	190 195 200		
	gca tca gaa gaa caa atc cta agg gca gct acg tcg atc tac ggg gct	797	
	Ala Ser Glu Glu Gln Ile Leu Arg Ala Ala Thr Ser Ile Tyr Gly Ala		
	205 210 215		

cca gga cag gca gag cca ccc caa gct ttc ata gac gaa gtt gcc aaa Pro Gly Gln Ala Glu Pro Pro Gln Ala Phe Ile Asp Glu Val Ala Lys 220 225 230	845
5 gtc tat gaa atc aac cat gga cgt ggc cca aac caa gaa cag atg aaa Val Tyr Glu Ile Asn His Gly Arg Gly Pro Asn Gln Glu Gln Met Lys 235 240 245	893
10 gat ctg ctc ttg act gcg atg gag atg aag cat cgc aat ccc agg cgg Asp Leu Leu Leu Thr Ala Met Glu Met Lys His Arg Asn Pro Arg Arg 250 255 260 265	941
15 gct cta cca aag ccc aag cca aaa ccc aat gct cca aca cag aga ccc Ala Leu Pro Lys Pro Lys Pro Asn Ala Pro Thr Gln Arg Pro 270 275 280	989
20 cct ggt cggtt ggc cgc tgg atc agg acc gtc tct gat gag gac ctt Pro Gly Arg Leu Gly Arg Trp Ile Arg Thr Val Ser Asp Glu Asp Leu 285 290 295	1037
25 gag tga ggatccggaa ttcaaaggcc tacgtcgacg agctcaactag tcgcggccgc Glu	1093
30 tttcgaatct agagcctgca gtctcgaggc atgcggtacc aagcttgcg agaagtacta gaggatcata atcagccata ccacattgt agaggttta cttgctttaa aaaacctccc acacctcccc ctgaacctga aacataaaat gaatgcaatt gttgttta acttgtttat tgcagcttat aatggttaca aataaagcaa tagcatcaca aatttcacaa ataaaggatt ttttcactg cattctagtt gtggttgtc caaactcatc aatgtatctt atcatgtctg 35 gatctgatca ctagatctgc ctaggagatc cgaaccagat aagtgaaatc tagttccaaa ctatttgtc attttaatt ttcgtattag cttacgacgc tacacccagt tcccatctat 40 tttgtcactc ttccctaaat aatccttaaa aactccattt ccacccctcc cagttcccaa ctatttgtc cgcccacagc gggcatttt tcttcctgtt atgttttaa tcaaacatcc tgccaaactcc atgtgacaaa cctgtcatctt cggctacttt ttctctgtca cagaatgaaa 45 attttctgt catctttcg ttattatgt ttgtattga ctgaatatca acgcttattt gcagcctgaa tggcgaatgg gacgcgcct gtagcggcgc attaagcgcg gcgggtgtgg 50 tggttacgcg cagcgtgacc gctacacttg ccagcgcct agcgcgcgt ccttcgcctt tcttccttc ctttcgtcc acgttcgcg gcttccccg tcaagctcta aatcgggggc tccctttagg gttccgattt agtgcatttac ggcacctcga ccccaaaaaa cttgatttagg 55 gtgatggttc acgttagtggg ccatgcgcct gatagacggt tttcgcgcct ttgacgttgg agtcacgtt ctttaatagt ggactcttgt tccaaactgg aacaacactc aaccctatct 60 cggtctattc ttttgattta taaggattt tgccgatttc ggcctattgg ttaaaaaatg	1153 1213 1273 1333 1393 1453 1513 1573 1633 1693 1753 1813 1873 1933 1993 2053 2113 2173

agctgattta acaaaaattt aacgcgaatt ttaacaaaat attaacgttt acaatttcag 2233
 gtggcacttt tcggggaaat gtgcgcggaa cccctatttgc ttatattttc taaatacatt 2293
 5 caaatatgtatccgctcatg agacaataac cctgataaaat gcttcaataa tattgaaaaaa 2353
 ggaagagtat gagtattcaa catttccgtg tcgccttat tccctttttt gcggcatttt 2413
 gccttcctgt ttttgcacccagaaacgc tggtgaaagt aaaagatgct gaagatcagt 2473
 10 tgggtgcacg agtgggttac atcgaactgg atctcaacag cggttaagatc cttgagagtt 2533
 ttcgccccga agaacgtttt ccaatgatga gcactttaa agttctgcta tgtggcgcgg 2593
 15 tattatccccg tattgacgcc gggcaagagc aactcggtcg ccgcatacac tattctcaga 2653
 atgacttgggt gtagtactca ccagtcacag aaaagcatct tacggatggc atgacagtaa 2713
 gagaattatg cagtgcgtgcc ataaccatga gtgataacac tgcggccaac ttacttctga 2773
 20 caacgatcgaggaccgaag gagctaaccg ctttttgca caacatgggg gatcatgtaa 2833
 ctcgccttga tcgttggaa ccggagctga atgaagccat accaaacgac gagcgtgaca 2893
 25 ccacgatgcc ttagcaatg gcaacaacgt tgcgcaaaact attaactggc gaactactta 2953
 ctctagcttc ccggcaacaa ttaatagact ggatggaggc ggataaagtt gcaggaccac 3013
 ttctgcgctc ggcccttccg gctggctgggt ttattgctga taaatctggta gcccggtagc 3073
 30 gtgggtctcg cggtacatttgcagcactgg ggccagatgg taagccctcc cgtatctgt 3133
 ttatctacac gacggggagt caggcaacta tggatgaacg aaatagacag atcgctgaga 3193
 35 taggtgcctc actgattaag cattggtaac tgcgtacca agtttactca tatatacttt 3253
 agattgattt aaaacttcat ttttaatttta aaaggatcta ggtgaagatc cttttgata 3313
 atctcatgac caaaatccct taacgtgagt ttgcgttcca ctgagcgtca gaccccttag 3373
 40 aaaagatcaa aggatcttct tgagatcctt ttttctgcg cgtatctgc tgcttgaaa 3433
 caaaaaacc accgctacca gcggtggttt gtttgcggta ctaagagcta ccaactctt 3493
 45 ttccgaaggt aactggcttc agcagagcgc agataccaaa tactgtcctt ctagtgttagc 3553
 cgtagttagg ccaccacttc aagaactctg tagcaccgc tacataccctc gctctgtcaa 3613
 tcctgttacc agtggctgct gccagtgccgataagtcgtg tcttaccggg ttggactcaa 3673
 50 gacgatgtt accggataag gcgcagcggc cgggctgaac ggggggttcg tgcacacagc 3733
 ccagcttggta gcgaacgacc tacaccgaac tgagataacct acagcgtgag cattgagaaa 3793
 55 gcgccacgt tcccgaaagg agaaaggcgg acaggatcc ggttaagcggc agggtcggaa 3853
 caggagagcg cacgagggag cttccagggg gaaacgcctg gtatctttat agtcctgtcg 3913
 ggtttcgcca cctctgactt gagcgtcgat ttttgtatg ctcgtcagggg gggcggagcc 3973
 60

tatggaaaaa cgccagcaac gcggccttt tacggttcct ggcctttgc tggcctttg 4033
 ctcacatgtt ctttcctgcg ttatcccctg attctgtgga taaccgtatt accgcctttg 4093
 5 agttagctga taccgctcgc cgccagccgaa cgaccgagcg cagcgagtca gtgagcgagg 4153
 aagcggagaaga gcgcctgatg cggtattttc tccttacgca tctgtgcggt atttcacacc 4213
 10 gcagaccagc cgcgtAACCT ggcaaaatcg gttacggttg agtaataaat ggatgcctg 4273
 cgtaagcggg tgtggcggcaataaaagtc taaaactgaa caaaatagat ctaaaactatg 4333
 acaataaaagt cttaaacttag acagaatagt tgtaaactga aatcagtcca gttatgctgt 4393
 15 gaaaaagcat actggacttt tgttatggct aaagcaaact cttcattttc tgaagtgcaa 4453
 attgcccgtc gtattaaaga gggcgtggc caagggcatg gtaaagacta tattcgcggc 4513
 20 gttgtgacaa ttaccgaac aactccgcgg ccggaaagcc gatctcggt tgaacgaatt 4573
 gttaggtggc ggtacttggg tcgatataa agtgcacac ttctccgt atgccaact 4633
 ttgtatagag agccactgcg ggatcgtcac cgtaatctgc ttgcacgtag atcacataag 4693
 25 caccaagcgc gttggcctca tgcttgagga gattgatgag cgcgggtggca atgcctgccc 4753
 tccggtgctc gccggagact gcgagatcat agatataat ctcactacgc ggctgctcaa 4813
 30 acctggcag aacgtaaagcc gcgagagcgc caacaaccgc ttcttggctg aaggcagcaa 4873
 gcgcgatgaa tgtcttacta cggagcaagt tcccggaggtt atcggagtcc ggctgatgtt 4933
 gggagtaggt ggctacgtct ccgaactcac gaccgaaaag atcaagagca gcccgcattgg 4993
 35 atttgacttg gtcagggccg agcctacatg tgcgaatgtat gcccatactt gagccaccta 5053
 actttgtttt agggcgactg ccctgctgcg taacatcggtt gctgctgcgt aacatcggtt 5113
 40 ctgctccata acatcaaaca tcgaccacg gctgtacgcg cttgctgctt ggatgcccga 5173
 ggcatacgact gtacaaaaaaa acagtcataa caagccatga aaaccgcccac tgcggccgtta 5233
 ccaccgctgc gttcggtcaa ggttctggac cagttgcgtg agcgcatacg ctacttgcatt 5293
 45 tacagtttac gaaccgaaca ggcttatgtc aactgggttc gtgccttcac ccgtttccac 5353
 ggtgtgcgtc acccggaac cttggcagc agcgaagtcg aggcatgtt gtcctggctg 5413
 50 gctgtacgc gcaagggttc ggtctccacg catcgtaagg cattggcggc cttgctgttc 5473
 ttctacggca aggtgctgtg cacggatctg ccctggcttc aggagatcg aagacctcg 5533
 ccgtcgcggc gcttgcgggt ggtgctgacc ccggatgaag tgggtcgat cctcggttt 5593
 55 ctggaaaggcg agcatcggtt gttcgccag gactctagct atagttctag tggttggcta 5653
 cgtataactcc ggaatattaa tag 5676

<210> 14
 <211> 298
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>

<223> Plásmido pFB/his-CD8-VP3

10 <400> 14

Met Ser Tyr Tyr His His His His His His Asp Tyr Asp Ile Pro Thr
 1 5 10 15

15 Thr Glu Asn Leu Tyr Phe Gln Gly Ala Asn Glu Asp Ser Tyr Val Pro
 20 25 30

Ser Ala Glu Gln Ile Ala Ala Met Ala Ala Ser Glu Phe Lys Glu Thr
 35 40 45

20 Pro Glu Leu Glu Ser Ala Val Arg Ala Met Glu Ala Ala Ala Asn Val
 50 55 60

Asp Pro Leu Phe Gln Ser Ala Leu Ser Val Phe Met Trp Leu Glu Glu
 25 65 70 75 80

Asn Gly Ile Val Thr Asp Met Ala Asn Phe Ala Leu Ser Asp Pro Asn
 85 90 95

30 Ala His Arg Met Arg Asn Phe Leu Ala Asn Ala Pro Gln Ala Gly Ser
 100 105 110

Lys Ser Gln Arg Ala Lys Tyr Gly Thr Ala Gly Tyr Gly Val Glu Ala
 115 120 125

35 Arg Gly Pro Thr Pro Glu Glu Ala Gln Arg Glu Lys Asp Thr Arg Ile
 130 135 140

Ser Lys Lys Met Glu Thr Met Gly Ile Tyr Phe Ala Thr Pro Glu Trp
 40 145 150 155 160

Val Ala Leu Asn Gly His Arg Gly Pro Ser Pro Gly Gln Val Lys Tyr
 165 170 175

45 Trp Gln Asn Lys Arg Glu Ile Pro Asp Pro Asn Glu Asp Tyr Leu Asp
 180 185 190

Tyr Val His Ala Glu Lys Ser Arg Leu Ala Ser Glu Glu Gln Ile Leu
 195 200 205

50 Arg Ala Ala Thr Ser Ile Tyr Gly Ala Pro Gly Gln Ala Glu Pro Pro
 210 215 220

Gln Ala Phe Ile Asp Glu Val Ala Lys Val Tyr Glu Ile Asn His Gly
 55 225 230 235 240

Arg Gly Pro Asn Gln Glu Gln Met Lys Asp Leu Leu Leu Thr Ala Met
 245 250 255

Glu Met Lys His Arg Asn Pro Arg Arg Ala Leu Pro Lys Pro Lys Pro
260 265 270

5 Lys Pro Asn Ala Pro Thr Gln Arg Pro Pro Gly Arg Leu Gly Arg Trp
275 280 285

Ile Arg Thr Val Ser Asp Glu Asp Leu Glu
290 295